

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2022年4月7日 (07.04.2022)



(10) 国际公布号  
**WO 2022/068898 A1**

(51) 国际专利分类号:

C07D 207/456 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C07D 401/14 (2006.01) C07K 5/027 (2006.01)  
A61K 31/537 (2006.01) C07K 5/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/121825

(22) 国际申请日: 2021年9月29日 (29.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202011046911.X 2020年9月29日 (29.09.2020) CN

(71) 申请人: 迈威(上海)生物科技股份有限公司(MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区李冰路576号(张江创想园)3号楼4楼, Shanghai 201210 (CN)。江苏迈威康新药研发有限公司(JIANGSU MABWELL HEALTH PHARMACEUTICAL R&D CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。

(72) 发明人: 周伟(ZHOU, Wei); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。朱会凯(ZHU, Huikai); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。王珍珍(WANG, Zhenzhen); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。徐辉(XU, Hui); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。谭小钉(TAN, Xiaoding); 中国江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼, Jiangsu 225300 (CN)。

(74) 代理人: 北京瑞恒信达知识产权代理事务所(普通合伙)(LEADING INTELLECTUAL

PROPERTY FIRM); 中国北京市西城区新街口街道平安里大街28号中海国际中心1802室, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

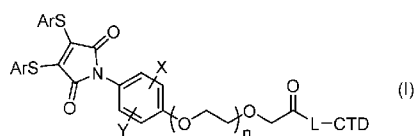
(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) Title: PREPARATION METHOD FOR BIS-SUBSTITUTED BRIDGING ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

(54) 发明名称: 一种双取代桥连抗体偶联药物的制备方法



(57) Abstract: A preparation method for a bis-substituted bridging antibody-drug conjugate, comprising: hydrolyzing an antibody coupling product obtained by coupling an antibody to a compound as represented by formula I. Also provided is an antibody coupling product obtained by the preparation method.

(57) 摘要: 一种双取代桥连抗体偶联药物的制备方法, 所述制备方法包括: 使抗体和式I所示的化合物偶联得到的抗体偶联产物进行水解。还提供通过所述制备方法得到的抗体偶联产物。



WO 2022/068898 A1

## 一种双取代桥连抗体偶联药物的制备方法

### 相关申请的交叉引用

本专利申请要求于 2020 年 9 月 29 日提交的申请号为 CN202011046911  
5 X 的中国发明专利申请的优先权权益，在此将其全部内容引入作为参考。

### 技术领域

本发明属于抗体药物制备工艺领域，具体而言，本发明涉及一种采用双  
取代马来酰亚胺连接子制备抗体偶联药物的方法。

10

### 背景技术

抗体偶联药物 (Antibody-drug conjugates, ADC) 是由抗体或抗体类配  
体与小分子药物以及将二者偶联起来的连接子共同组成的一种新型肿瘤治  
疗药物，其结合了小分子药物的抗肿瘤活性和抗体或抗体类配体的高选择  
15 性、稳定性和良好的药代动力学特征，是目前肿瘤治疗领域的关注热点。

偶联技术与制备工艺对于发展 ADC 药物极为关键。为了确保这类药物  
的临床安全性和有效性，不仅需要实现药物与抗体的稳定连接，而且需尽量  
降低 ADC 产物的异质性。目前普遍应用第三代 ADC 偶联技术，主要分为非  
天然氨基酸的定点偶联技术、酶催化定点偶联技术以及化学修饰定点偶联技  
20 术这三类。其中，前两类技术通常需要对抗体进行特殊改造，因此相对而言，  
化学修饰定点偶联技术是一类对普通抗体分子更通用的抗体偶联药物制备  
技术，其主要利用特定结构的连接子以及与其相适应的偶联工艺以实现定点  
偶联。例如，专利申请 CN201380025774.3 公开了一种采用桥状连接子制备  
ADC 药物的制备方案；专利申请 CN201310025021.4 公开了一种采用三齿型  
25 连接子的 ADC 药物制备方案。

迈威 (上海) 生物技术有限公司和下属子公司江苏迈威康生物开发了一  
种连接子新技术，基于该技术提供了一种新型的双取代马来酰亚胺类连接子  
以及利用该连接子制备的 ADC 药物 (参见 WO2018/095422A1)，得到的  
ADC 药物基于双取代马来酰亚胺的二硫链桥接，具有更好的稳定性，在体  
30 内不易发生硫醚交换，具有良好的药物体内体外活性。但是，已发现使用  
WO2018/095422A1 中公开的工艺路线制备的 ADC 药物往往会有产品均一性  
不佳的问题，推测出现了较为严重的小分子药物脱落。在药物安全性方面，

小分子药物脱落会导致非靶向毒性，为药物开发带来较大的安全隐患。

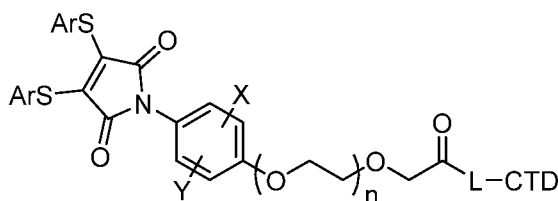
因此，本领域亟需开发一种与双取代马来酰亚胺类连接子相适应的、简单、高效、稳定且具有应用价值的定点偶联药物制备工艺。

## 5 发明内容

实验证明，在 WO2018/095422A1 所公开的工艺条件下制备的 ADC 药物仍然无法满足临床用药的安全、有效、稳定等质量要求，无法实现产品商业化生产。为了解决这一问题，本发明的目的是提供一种双取代桥连抗体偶联药物的新的制备方法。

10 本发明的技术方案如下：

一种双取代桥连抗体偶联药物的制备方法，所述制备方法包括：使抗体和式 I 所示的化合物偶联得到的抗体偶联产物进行水解：



I

15

式 I 中，Ar 为苯基或取代苯基，所述取代苯基中的取代基选自烷基（例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C3 烷基，更优选甲基）、烷氧基（例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C3 烷氧基，更优选甲氧基）、卤素（F、Cl、Br 或 I）、酯基、氰基和 -C(O)NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>-，其中 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 独立地选自化学键、H 和烷基（例如 C1-C6 烷基、优选 C1-C3 烷基，更优选甲基），或 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 形成 5-7 元杂环，杂原子选自 O、N 和 S 中的一个或多个；

20

X 和 Y 独立地为氢、卤素（F、Cl、Br 或 I）、三氟甲基或烷氧基（例如 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C3 烷氧基，优选甲氧基）；

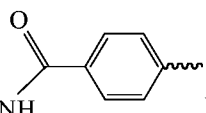
n 为 1~24 中的任意整数；

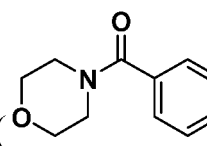
25

L-CTD 为应用于抗体偶联药物中的细胞毒药物及连接释放结构。其中，L 例如选自 Val-Ala-PAB (VA-PAB)、Val-Cit-PAB (VC-PAB)、Phe-Lys-PAB 和 MAC glucuronide phenol 连接子；CTD 例如为细胞毒药物，优选微管抑制剂（例如，微管抑制剂类 MMAE、DM1、DM4、Tublysin）；拓扑异构酶抑制剂（例如，拓扑异构酶抑制剂类 SN38、依喜替康以及依喜替康衍生物）

或 DNA 结合剂（例如，DNA 结合剂 PBD 及其衍生物）。PAB 为对-氨基苄氧羰基。

优选地，R1 和 R2 独立地选自 H 和 C1-C3 烷基；或者 R1 和 R2 形成 6 元杂环，杂原子选自 O 和 N 中的一个或多个，优选为吗啉。

5 更优选地，Ar 为苯基、4-甲基甲酰胺基取代苯基()或 4-

甲酰基吗啉取代苯基();

优选地，X 和 Y 独立地为氢、氟、三氟甲基或甲氧基；更优选地，X 和 Y 独立地为氢，或者 X 和 Y 独立地位于苯环上相对马来酰亚胺的间位；

优选地，n 为 1~10、优选 3~5 中的任意整数；

10 优选地，L-CTD 为 VC-PAB-MMAE 或 VC-seco-DUBA。

优选地，所述水解在所述抗体偶联产物的纯化之前或之后进行。

15 优选地，所述水解包括：将抗体偶联产物在 pH 7.4-9.0 的水解缓冲液中在 25-45°C 下加热 1-24 h。其中所述水解缓冲液可包含磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、枸橼酸、甘氨酸、氨基丁三醇、盐酸精氨酸、盐酸、磷酸、氢氧化钠和氢氧化钾中的一种或多种。优选地，所述水解缓冲液为磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液、磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液或氨基丁三醇缓冲液。

优选地，所述抗体偶联产物在水解缓冲液中的浓度为 2-30mg/mL、优选 5-20mg/mL。

20 更优选地，所述水解包括：将抗体偶联产物在所述水解缓冲液中在 25-35°C 下加热 1-6 h、优选 1-3 h。其中优选地，所述水解缓冲液为 pH 7.5-8.5，优选 pH 7.8。例如，所述水解缓冲液为 pH 7.5-8.5 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液。

25 根据本发明的具体实施方案，所述水解缓冲液为：50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液，pH 7.8；50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液+ 3%精氨酸，pH 7.8；50mM 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液，pH 7.8；或 50mM 氨基丁三醇-盐酸缓冲液，pH 7.8。

优选地，所述抗体为 IgG，优选 IgG1。

根据本发明的具体实施方式，所述抗体偶联药物根据 WO2018/095422A1 中公开的方法制备。

具体而言，本发明提供的制备方法包括以下步骤：

5 a. 抗体还原：将 $\geq 5.5$ 倍抗体摩尔当量的还原剂加入到含 5-30mg/mL 浓度抗体的缓冲液中，在 30-40°C 下反应 1.5-2 h，其中所述还原剂为选自 TCEP、DTT、2-MEA 和 DTBA 中的一种或多种；

10 b. 抗体偶联：将步骤 a 中经还原的抗体置换到 pH 6.5-7.6 的缓冲液中，并将抗体稀释到 3.5-15mg/mL 浓度，将溶解于有机共溶剂中的 4.5-6.5 倍抗体摩尔当量的式 I 所示的化合物加入到所述抗体稀释液中，使得所述有机共溶剂占反应体系体积的 5%-30%，在 15-35°C 下搅拌反应 $\geq 0.5$  h，其中所述有机共溶剂为选自 DMA、DMSO、DMF 和 ACN 中的一种或多种；

15 c. 疏水层析：使用疏水填料对抗体偶联产物进行疏水层析纯化，所述疏水填料为 Butyl Sepharose HP (GE)、Capto Phenyl Impres (GE)、Toyopearl Butyl 650M (TOSOH) 或 Butyl Sepharose 4FF (GE)，固定相使用氯化钠或硫酸铵作为层析盐的缓冲液；并且

所述制备方法在步骤 b 之后或步骤 c 之后还包括以下步骤：

20 d. 水解：将抗体偶联产物置换到 pH 7.4-9.0 的水解缓冲液中，在 25-45°C 下加热 1-24 h。其中所述水解缓冲液可包含磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、磷酸二氢钾、枸橼酸、甘氨酸、氨基丁三醇、盐酸精氨酸、盐酸、磷酸、氢氧化钠和氢氧化钾中的一种或多种。

在本发明的方法中，步骤 a、b 和 d 中的置换采用分子筛、超滤离心管或超滤膜包进行。

在本发明的制备方法的步骤 a 中：

优选地，所述还原剂为 TCEP 或 DTT；

25 优选地，所述还原剂为 6.5-10 倍抗体摩尔当量；

优选地，所述还原剂以 5-15mg/mL、优选 10mg/mL 的水溶液形式加入；

优选地，所述抗体为 IgG，优选 IgG1；

优选地，所述抗体的浓度为 10-15mg/mL、优选 12mg/mL；

30 优选地，所述缓冲液为 pH 6.5-7.6 的磷酸盐缓冲液。根据本发明的具体实施方式，所述缓冲液为 pH 7.4、50mM 的磷酸盐缓冲液。

在本发明的制备方法的步骤 b 中：

优选地，所述缓冲液为 pH 7.2-7.4；优选地，所述缓冲液为 pH 7.2-7.4

的磷酸盐缓冲液或磷酸盐-EDTA 缓冲液。根据本发明的具体实施方式，所述缓冲液为 50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠+100mM NaCl+2mM EDTA 缓冲液，pH 7.2-7.4；

优选地，置换时将抗体稀释到 3.5-10mg/mL 浓度；

5 优选地，所述式 I 所示的化合物为 5.0-6.0 倍抗体摩尔当量；

优选地，所述有机共溶剂为 DMA、DMSO 或 ACN；

优选地，使得所述有机共溶剂占反应体系体积的 6%-30%；

优选地，在 15-35°C 下搅拌反应 0.5-1 h。

在本发明的制备方法的步骤 c 中：

10 优选地，固定相使用以硫酸铵作为层析盐的缓冲液。根据本发明的具体实施方式，硫酸铵浓度优选为 0.45mol/L；

优选地，固定相使用以硫酸铵作为层析盐的磷酸盐缓冲液，洗脱相为磷酸盐缓冲液。

更优选地，磷酸盐为 0-100mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液，pH  
15 7.4-8.0。

在本发明的制备方法的步骤 d 中：

优选地，所述抗体偶联产物在水解缓冲液中的浓度为 2-30mg/mL、优选  
5-20mg/mL；

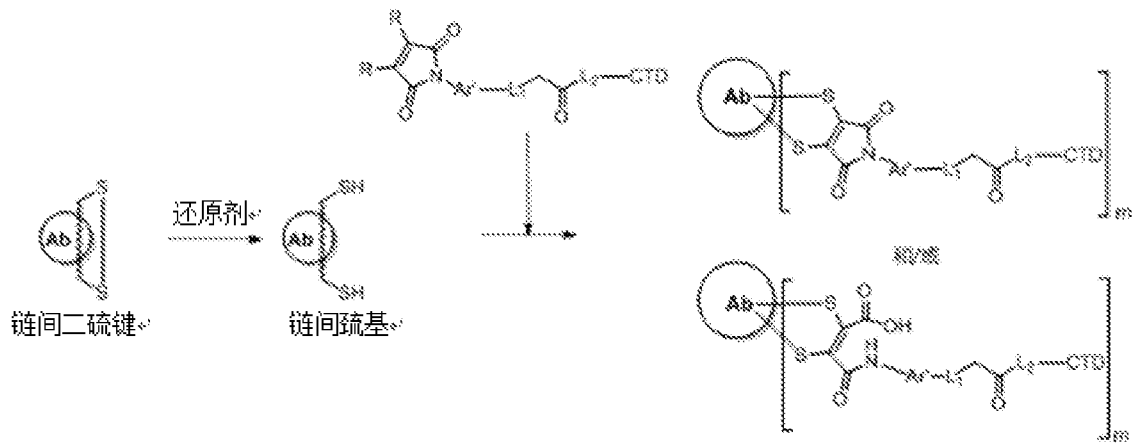
20 优选地，所述水解缓冲液为磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液、磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液或氨基丁三醇缓冲液；

优选地，所述水解包括：将抗体偶联产物在所述水解缓冲液中在 25-35°C  
下加热 1-6 h、优选 1-3 h。其中优选地，所述水解缓冲液为 pH 7.5-8.5，优选  
pH7.8。例如，所述水解缓冲液为 pH 7.5-8.5 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲  
液。

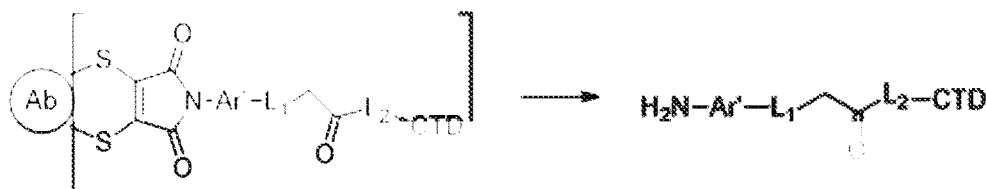
25 根据本发明的具体实施方案，所述水解缓冲液为：50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液，pH 7.8；50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液+ 3%精氨酸，pH 7.8；50mM 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液，pH 7.8；或 50mM 氨基丁三醇-盐酸缓冲液，pH 7.8。

30 另一方面，本发明提供通过本发明的方法得到的双取代桥连抗体偶联药物。

WO2018/095422A1 描述了如下 ADC 制备工艺：



因此，制得两种结构的 ADC 混合产物。实验证明，该混合药物体外、体内稳定性不佳，在给药过程中具有严重的输入反应。这可能是由于小分子药物从抗体上脱落，从而对药物的药效和安全性带来不同程度的负面影响。



5

为了改善这一问题，本发明的方法中，在抗体偶联得到 ADC 药物的步骤后，进一步引入了水解步骤，该步骤可在 ADC 药物的柱色谱纯化之前或之后进行。例如，可将两个步骤各自的产物在 pH 8.0±0.5 水解缓冲液（例如 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液）中孵育，使得一分子马来酰亚胺可以和一分子水发生加成反应，生成开环的羧酸类化合物，从而获得均一的开环结构的 ADC 药物。实验证明，经过水解处理后，ADC 药物的产物结构更加均一，该均一 ADC 药物产物在血浆中 37℃ 孵育过程中，小分子药物的脱落明显减少。

10

此外，本发明的方法就抗体还原、偶联与色谱纯化操作步骤中采用的反应参数进行了进一步筛选，使得最终 ADC 药物可以实现更高的纯度，非还原毛细管电泳纯度大于 95%。同时，经实验验证，此工艺流程可顺利放大，且放大后得到的偶联样品理化性质与小试偶联样品基本一致。

15

附图说明

20

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

图 1 为实施例 7 中以不同抗体采用本发明的制备方法得到的 ADC 产物样品表征结果，其中：

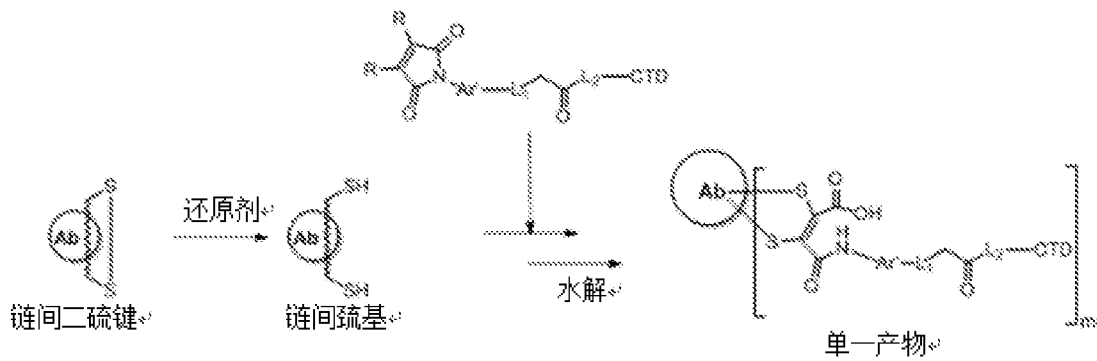
1A 至 1C 分别是以 Pertuzumab 得到的产物的 HIC-HPLC、NR-CE-SDS 和 SEC-HPLC 表征结果。

图 2 为实施例 8 中不经过水解与经过水解的组 A 和组 B 的 ADC 产物样品表征结果，其中：

- 5 2A 至 2B 分别是组 A 和组 B 样品的 HIC-HPLC 表征结果；
- 2C 至 2D 分别是组 A 和组 B 样品的 SEC-HPLC 表征结果；
- 2E 至 2F 分别是组 A 和组 B 样品的 NR CE-SDS 表征结果。

实施发明的最佳方式

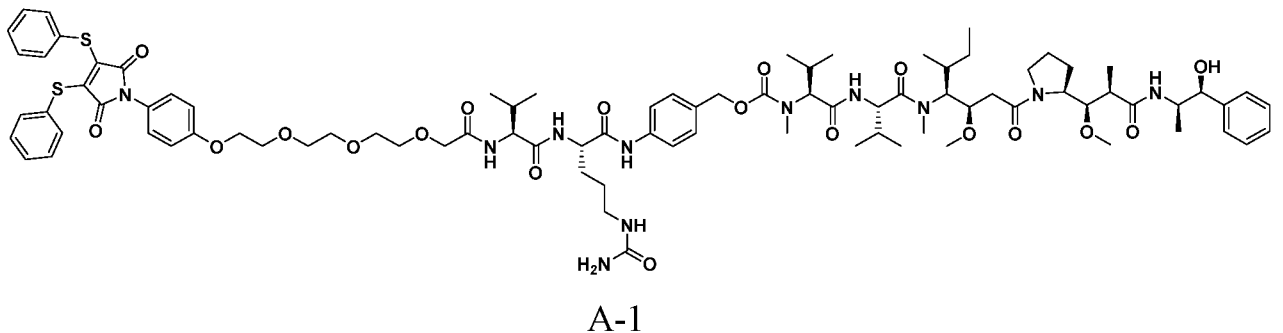
- 10 本发明的方法提供如下所示的质量更加稳定、更加均一的 ADC 产物：

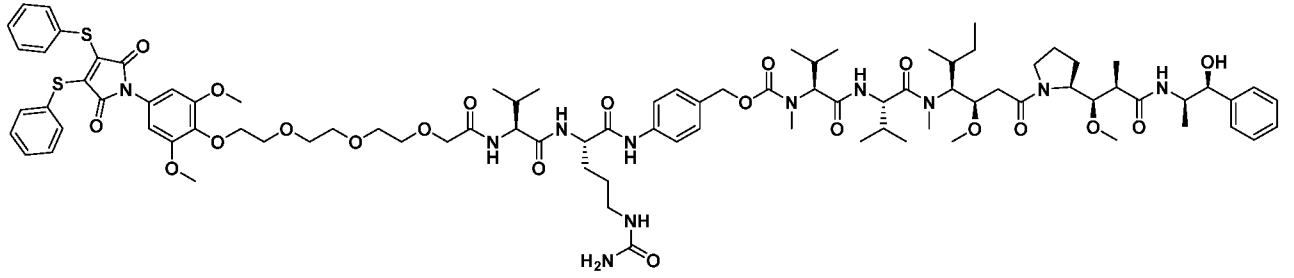


本发明中提到的“当量”均为与抗体相比的摩尔当量比。

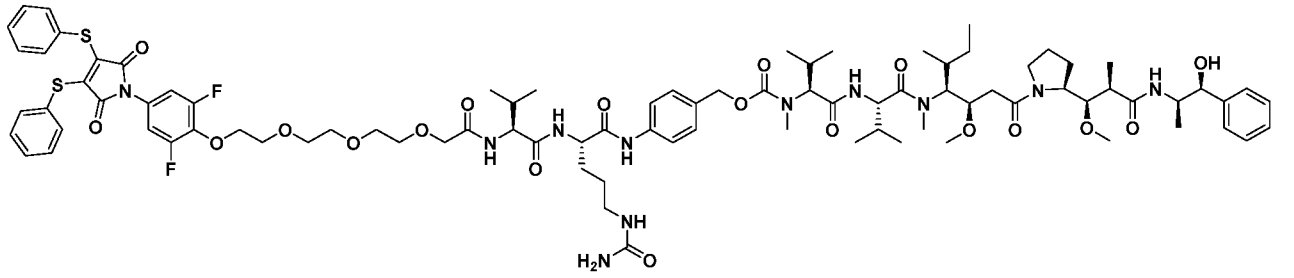
本发明中提到的“式 I 所示的化合物”在本文中与“小分子”或“小分子化合物”可互换使用，结构示例如下：

- 15 A 系列分子：

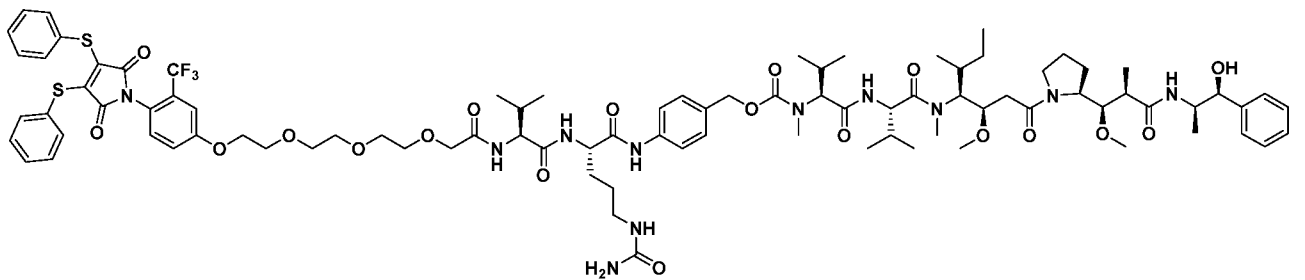




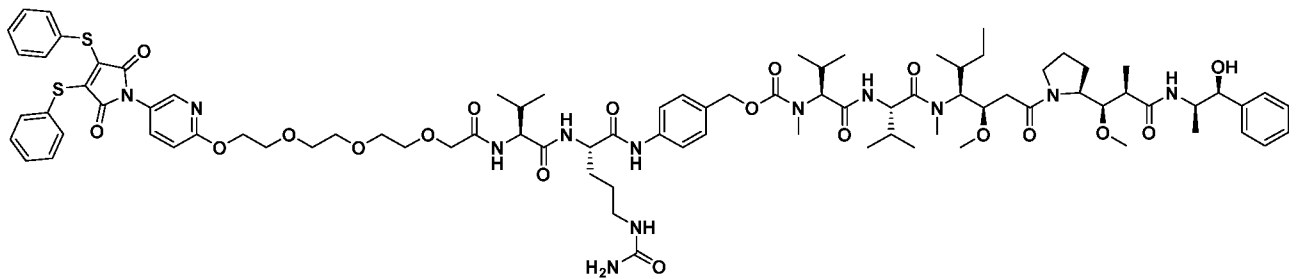
A-2



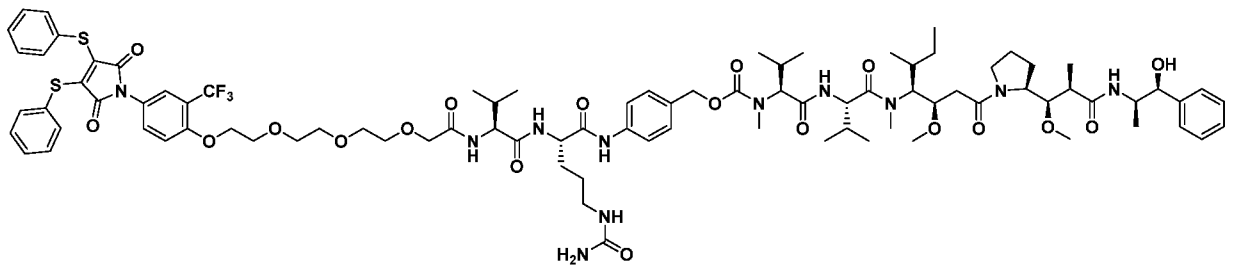
A-3



A-4



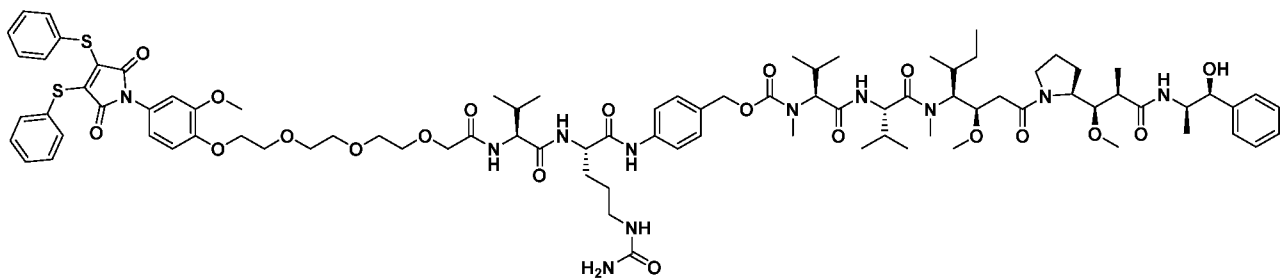
A-5



A-6

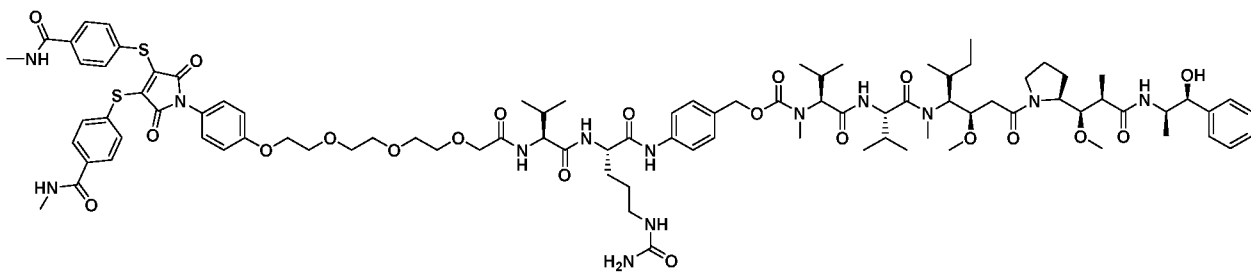
5

10



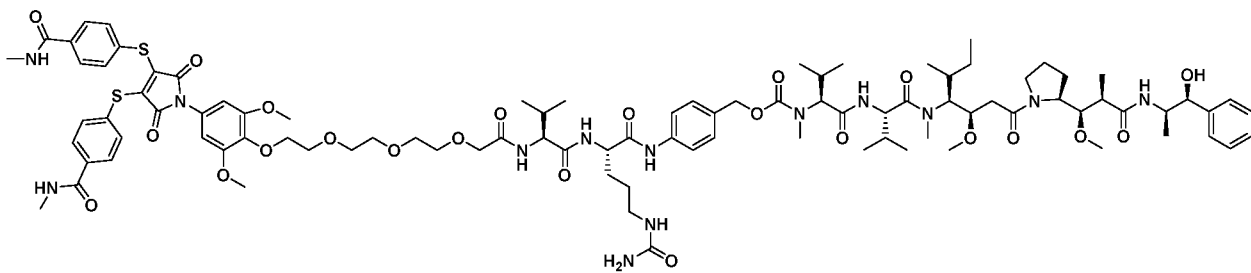
A-7

B 系列分子:

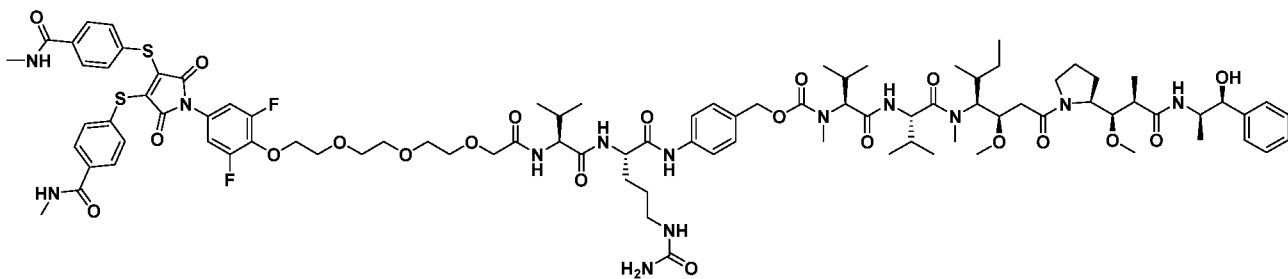


B-1

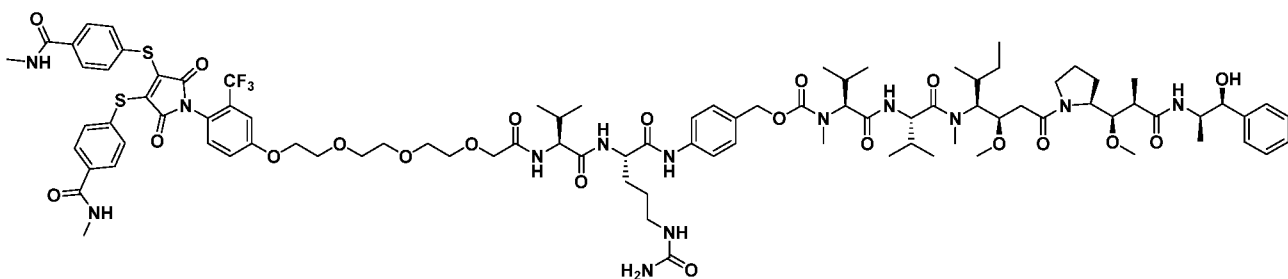
5



B-2

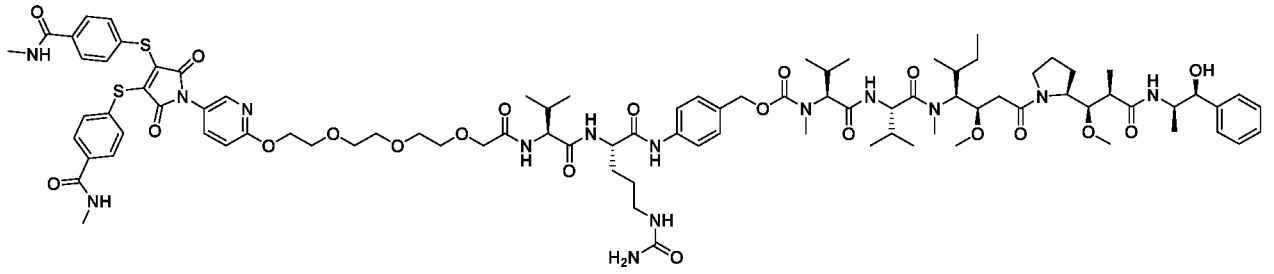


B-3

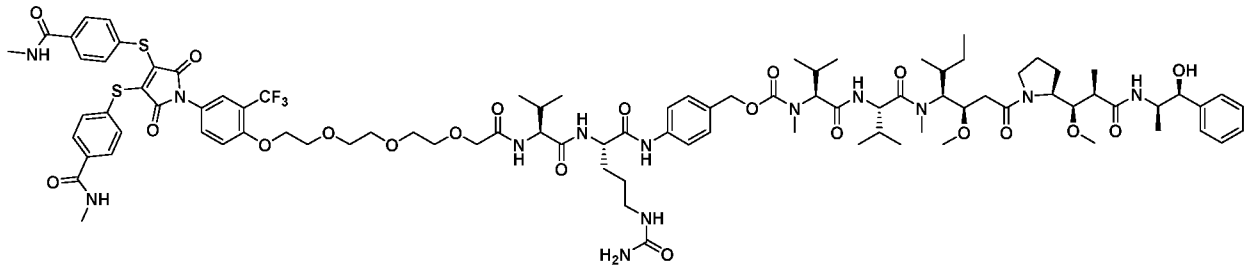


B-4

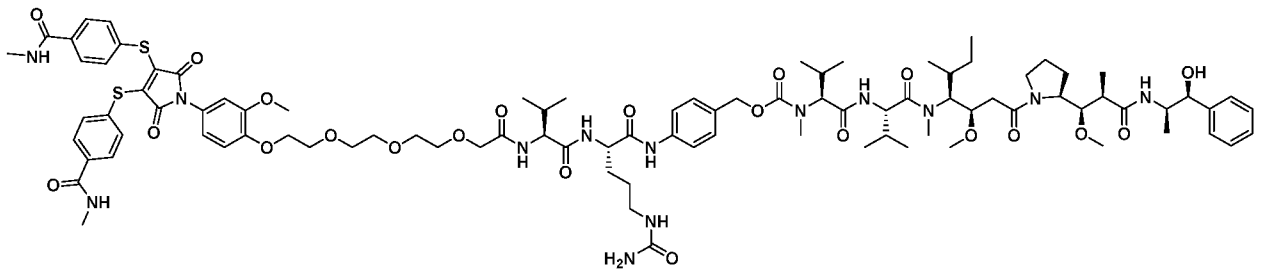
10



B-5



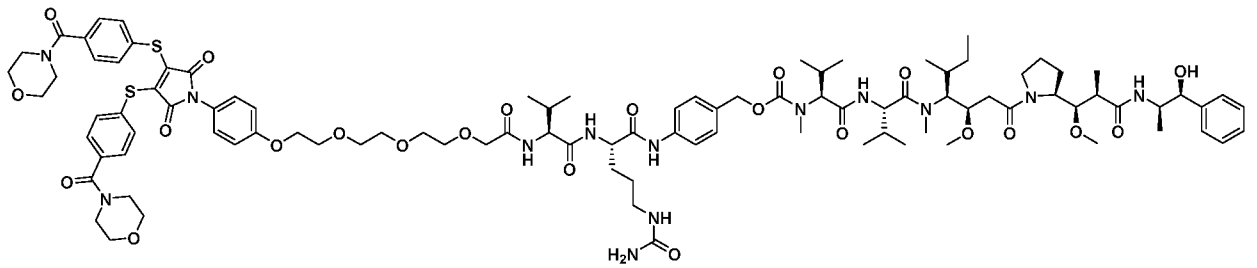
B-6



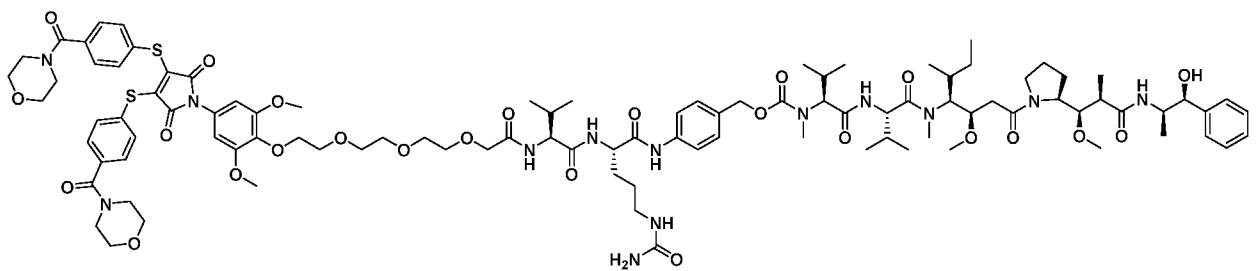
B-7

5

C 系列分子:



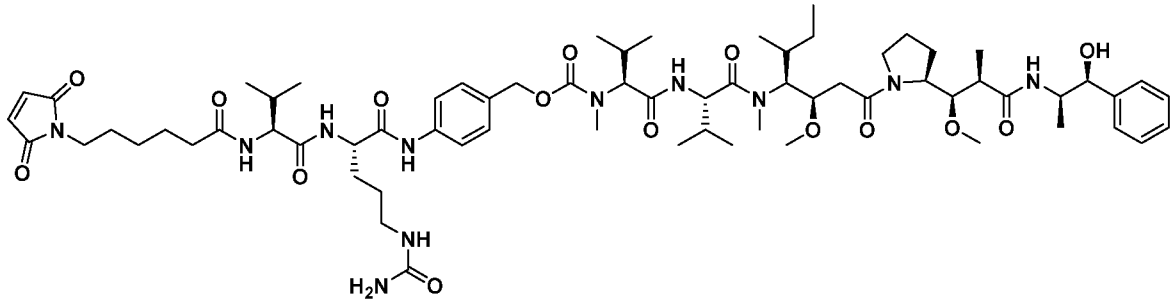
C-1



C-2

10





D-1

本发明中使用的“PB”特指磷酸氢二钠-磷酸二氢钠为主要成分的磷酸  
 5 钠缓冲液。不同 pH 值的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液通常使用相同浓度  
 的磷酸二氢钠、磷酸氢二钠溶液互调得到。

通用检测方法包括：

(1) 疏水作用色谱 HIC-HPLC：

(a1) 定点偶联药物疏水色谱 HIC-HPLC 测定 DAR 值

10 样品制备：样品用流动相 B 稀释至 2.0 mg/ml 后，12000 rpm 离心 10 min，  
 取上清用于 HPLC 分析；

色谱柱：Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5，5 $\mu$ m，4.6mm $\times$ 35mm；

流动相 A：0.025M 磷酸盐+1.2M 硫酸铵(pH 7.0)；

流动相 B：0.025M 磷酸盐(pH 7.0)；

15 流动相 C：100% IPA；

流速：0.8mL/min；

检测波长：280nm；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

上样量：20  $\mu$ L。

20 HIC 色谱梯度

时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%	流动相 C%
0	100	0	0
1	100	0	0
12	0	80	20
16	0	80	20
17	100	0	0
21	100	0	0

DAR 计算公式:

$DAR = \frac{\sum (\text{加权峰面积})}{100}$ , 即  $DAR = (D0 \text{ 峰面积比} \times 0 + D1 \text{ 峰面积比} \times 1 + D2 \text{ 峰面积比} \times 2 + D3 \text{ 峰面积比} \times 3 + D4 \text{ 峰面积比} \times 4 + D5 \text{ 峰面积比} \times 5 + D6 \text{ 峰面积比} \times 6 + D7 \text{ 峰面积比} \times 7 + D8 \text{ 峰面积比} \times 8) / 100$ 。

5 注: A、B、及 C 系列分子采用 (a1) 分析方法测定 DAR 值。

(a2) 定点偶联药物疏水色谱 HIC-HPLC 测定 DAR 值

样品制备: 样品用流动相 B 稀释至 3.0 mg/ml 后, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清用于 HPLC 分析;

色谱柱: Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 $\mu$ m, 4.6mm $\times$ 35mm;

10 流动相 A: 125 mM PB+2.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH6.7) ;

流动相 B: 125 mM PB (pH6.7) ;

流动相 C: IPA;

流动相 D: H<sub>2</sub>O;

流速: 0.5mL/min;

15 检测波长: 280nm;

柱温: 25 $^{\circ}$ C;

上样量: 10  $\mu$ L。

HIC 色谱梯度

时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%	流动相 C%	流动相 D%
0	80	0	0	20
20	5	45	3	47
22	0	50	3	47
22.1	80	0	0	20
30	80	0	0	20

DAR 值计算如 (a1) 方法中所述。

20 注: L 系列分子采用 (a2) 分析方法测定 DAR 值。

(a3) 随机偶联药物疏水色谱 HIC-HPLC 测定 DAR 值

样品制备: 样品用流动相 B 稀释至 2.0 mg/ml 后, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清用于 HPLC 分析;

色谱柱: TOSOH Butyl NPR, 2.5 $\mu$ m, 4.6mm $\times$ 100mm;

25 流动相 A: 125mM PB +2.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 6.8) ;

流动相 B: 125mM PB (pH 6.8) ;

流动相 C: 100% IPA;

流动相 D: H<sub>2</sub>O;

流速: 0.7mL/min;

检测波长: 280nm;

5 柱温: 30°C;

上样量: 10 μL。

HIC 色谱梯度

时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%	流动相 C%	流动相 D%
0	50	0	5	45
10	0	50	5	45
20	0	50	5	45
20.1	50	0	5	45
35	50	0	5	45

DAR 值计算如 (a1) 方法中所述。

注: D 系列分子采用 (a3) 分析方法测定 DAR 值。

10 所提到的 D3%、D4%、D5% 分别代表 DAR 值为 3、4、5 的 ADC 所占的百分比。

(2) D-SEC:

色谱柱: Zenix-C SEC-300;

流动相: 水:乙腈=65:35 (均含 0.1%TFA 和 0.1%FA) ;

15 流速: 0.2 mL/min;

柱温: 25°C;

检测波长: 280nm;

洗脱梯度: 等度洗脱。

(3) 非还原毛细管电泳 NR-CE-SDS:

20 样品处理: 将样品稀释至 2.0mg/ml (样品缓冲液: 40mM PB, 1% SDS, pH 6.5), 取 50μL+45μL 样品缓冲液+5μL IAM (0.5 M), 混匀, 70°C 水浴 10min, 取上清进样分析。

分析条件:

25 毛细管活化: 20 psi 压力下, 0.1 mol/L 的氢氧化钠、0.1 mol/L 的盐酸、注射水分别冲洗 10 min、5 min、2 min; 70 psi 压力下, SDS-MW-Gel Buffer 冲洗 10 min; -15 kv 电压、20 psi, 25°C 的柱温下, 预分离 10 min; 运行程

序：70 psi，分别以 0.1 mol/L 的氢氧化钠、0.1 mol/L 的盐酸、注射水冲洗毛细管 3 min、1 min、1 min；随后灌胶 10 min，在 -5 kv 条件进样 40 s，运行分离程序（-18 kv、20 psi）。柱温 25℃、分离电压 -15 kv 分离时间 40 min。

(4) 分子排阻色谱 SEC-HPLC:

5 样品处理：样品用流动相稀释至约 2.0-3.0 mg/ml 后，12000 rpm 离心 10 min，取上清进样分析。

色谱柱：TOSOH, TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>, 5 μm, 7.8mm×300mm;

流动相：100mM PB+200 mM 盐酸精氨酸，5%异丙醇（pH 6.8）；

流速：0.6 mL/min;

10 检测波长：280 nm;

柱温：30℃;

上样量：10 uL;

洗脱梯度：等度洗脱。

(5) Native Ms:

15 色谱柱：ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200A（1.7 μm, 2.1mm×150mm）；

流动相：50mM 乙酸铵；

运行时间：12min;

流速：0.065mL/min;

20 进样体积：2μL;

柱温：30℃;

检测波长：280nm;

毛细管：3.0kV;

锥孔电压：140V;

25 源偏离：80V;

源温度：125℃;

脱溶剂气温度：250℃;

脱溶剂气流量：600L/h;

(6) LC-MS:

30 液相色谱质谱（LC-MS）偶联是一种分析 ADC 中 DAR 和药物分布的正交技术。

样品处理：使用 1 μL PNGase F/100 μg mAb，对样品进行去糖基化处理，

37°C下过夜反应。分析开始前，利用 20 mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）进行还原，37°C孵育 30min。样品上样之前，用水稀释至 1 mg/mL。

LC-MS 色谱条件：

5 色谱柱：PLRP-S 色谱柱（Agilent），颗粒大小 5 μm，1000Å，内径 2.1 mm，长度 50 mm；

流动相：流动相 A 为 0.1%甲酸和 0.025%三氟乙酸的水溶液，流动相 B 为 0.1%甲酸和 0.025%三氟乙酸的乙腈溶液；

流速：0.25 mL/min；

10 电喷雾电压设为 4500~5000V，原温设为 350°C，气帘和雾化气设置为 40；

进样量：15~20 μg。

LC-MS 色谱梯度

时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%
0	10	90
10	10	90
30	90	10
35	90	10
36	10	90
45	10	90

(7) 溶液置换：

无特殊说明情况下，使用 30k 超滤离心管，6500r/min 离心换液。

15 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

实施例 1 抗体还原条件实验筛选

20 a. 还原剂选择

将 pertuzumab 置换至 pH7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，并稀释至 12.2mg/ml。加入 8.5 倍抗体摩尔当量的二硫苏糖醇（DTT）或三羧基乙基磷（TCEP）的浓度为 1.0 mg/ml 的水溶液，35°C下反应 1.5 h。然后，与预先溶解在 DMA 中的 C-3 在 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中 25°C下搅拌 1h。偶联后样品换液至 pH 7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢

25

钠缓冲液中，取样进行 HIC-HPLC 检测。检测结果见表 1-1。

表 1-1. 不同种类还原剂还原抗体后偶联结果

还原剂	HIC-HPLC (D3%/D4%/D5%)
DTT	12.93/77.93/8.24
TCEP	7.59/81.87/10.05

结果显示：还原剂 TCEP 与 DTT 得到的最终结果无显著差异。

#### b. 还原剂用量选择

- 5 将 pertuzumab 置换至 pH7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，并稀释至 12mg/ml，将不同当量 TECP、DTT 的水溶液加入反应体系，35℃ 下反应 1.5 h。分别取样进行 D-SEC 检测，分析未还原抗体剩余量。检测结果见表 1-2。

表 1-2. 不同当量还原剂还原抗体后的未还原抗体剩余量

还原剂	还原剂当量	D-SEC (%)
TCEP	100	1.2
	20	1.4
	10	1.3
	6.5	1.5
	5.5	10.7
DTT	100	1.3
	20	1.2
	10	1.5
	6.5	1.7
	5.5	1.8
	5.0	8.9

- 10 结果显示：TCEP 当量 $\geq 6.5$  或 DTT 当量 $\geq 5.5$ ，抗体充分还原，还原剂的优选当量范围为 6.5-10。

### 实施例 2 抗体偶联条件实验筛选

#### a. 小分子当量选择：

- 15 将 pertuzumab 置换至 pH7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，

并稀释至 12mg/ml，加入 10mg/ml 浓度的 TECP 水溶液，35℃下孵育 2 h，然后将还原后的 pertuzumab 置换至 pH7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+100mM NaCl+2mM EDTA 缓冲液中，并稀释至 8mg/ml。将 4.5-6 当量的小分子化合物 C-3 溶解在有机溶剂 DMA 中，加入到反应体系中，其中 DMA 占整个反应体积 10%，加热搅拌 60 min。反应结束后，使用超滤离心管将抗体偶联药物置换至 pH 7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，除去偶联反应中过量的化合物 C-3，同时降低溶液中的 DMA 溶剂含量。使用疏水色谱 HIC-HPLC 对样品各组分进行分析，结果见表 2-1。

表 2-1. 不同小分子当量对偶联结果的影响

小分子当量	D3%	D4%	D5%
6.5	5.63	66.02	26.21
6.0	7.82	73.22	18.81
5.5	6.97	75.63	17.23
5.0	6.67	78.83	13.91
4.5	15.32	65.25	6.54

结果显示:当反应当量在 5.5±0.5 的范围内,反应体系较澄清,HIC-HPLC 图谱中主峰 (D4) 的比例较高。

#### b. 反应 pH 选择:

将 pertuzumab 置换至 pH7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，并稀释至 12mg/ml，将 10mg/ml 浓度的 TECP 水溶液加入反应体系，在 35℃下孵育 2 h，将还原后的 pertuzumab 分别置换至 pH 6.8-7.8 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+100mM NaCl+2mM EDTA 缓冲液中，并稀释至 5mg/ml。将 5.0 当量的化合物 C-3 溶解在有机溶剂 DMA 中，加入到反应体系中，其中 DMA 占整个反应体积 10%，加热搅拌 60 min。反应结束后，用 pH7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液进行置换。使用疏水色谱 HIC-HPLC、NR-CE-SDS 对样品各组分进行分析，结果见表 2-2。

表 2-2. 不同 pH 对偶联结果的影响

pH	HIC-HPLC (D3%/D4%/D5%)	NR-CE-SDS 纯度 (%)
6.5	7.57/78.76/13.49	93.8
6.7	5.89/83.12/10.98	94.8
7.0	5.62/81.82/12.56	94.7

7.3	5.38/80.72/13.91	94.3
7.6	3.88/82.47/10.65	93.9
7.8	8.12/76.53/15.17	90.3

结果显示:当反应 pH 值在 6.5-7.6 的范围内,反应体系较澄清,HIC-HPLC 主峰的比例较高,且 NR-CE-SDS 纯度良好。

c. 反应共溶剂与比例选择:

pertuzumab 还原过程参照实施例 2b。还原后抗体换液、稀释至约 5.0mg/ml,并进行分组。各组根据表 2-3 所示,使用有机溶剂 N,N-二甲基乙酰胺 (DMA)、二甲基亚砷 (DMSO)、乙腈 (ACN),将化合物 C-3 使用这些溶剂中任一种溶解至 20mg/mL,根据抗体总量 5 倍摩尔当量计算化合物 C-3 溶液的投料体积,并向二者的反应体系中补加相应溶剂达到表 2-3 中所示的溶剂比例。在 25°C 下搅拌 1 h,置换反应体系至 pH7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中,分别取样,使用疏水色谱 HIC-HPLC、NR-CE-SDS 对样品各组分进行分析,结果见表 2-3。

表 2-3. 不同有机溶剂作为共溶剂的偶联结果

溶剂名称	溶剂比例 (%)	反应体系澄清度	HIC-HPLC (D3%/D4%/D5%)	NR-CE-SDS (%)
DMA	40	混浊	3.94/77.15/19.38	76.9
	30	澄清	3.96/79.78/16.37	87.6
	20	澄清	4.41/80.09/15.37	88.9
	15	澄清	6.37/80.12/13.45	89.3
	10	澄清	7.59/81.87/10.05	94.4
	8	澄清	7.43/82.65/9.54	94.6
	6	澄清	7.59/81.87/10.05	93.7
	4	澄清	12.54/76.87/9.56	92.1
DMSO	40	澄清	3.54/75.15/21.28	76.6
	30	澄清	3.85/79.73/16.41	86.3
	20	澄清	4.22/80.05/15.64	87.9
	15	澄清	6.34/80.02/13.54	89.1
	10	澄清	12.93/77.93/8.24	93.9

	8	澄清	10.34/79.45/8.16	94.1
	6	澄清	10.27/78.73/7.98	92.9
	4	混浊	20.10/70.65/7.92	90.6
ACN	40	混浊	4.97/73.65/21.17	77.4
	30	澄清	4.46/78.63/16.72	87.1
	20	澄清	5.23/79.89/14.76	88.6
	15	澄清	6.46/80.02/13.47	89.7
	10	澄清	11.12/73.93/12.24	93.4
	8	澄清	10.13/75.93/11.82	95.3
	6	澄清	10.13/75.93/11.82	93.6
	4	混浊	17.54/68.91/12.13	90.72

结果显示：DMA、DMSO 和 ACN 皆可作为该工艺步骤共溶剂，但优选 DMA、DMSO。DMA 比例>4%或 DMSO、ACN 比例>6%，有机共溶剂比例≤30%，偶联反应体系澄清，反应结果良好。

d. 抗体浓度选择：

- 5 抗体还原参见实施例 2a，还原结束后，用 pH 7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+100mM NaCl+2mM EDTA 缓冲液置换，并将抗体稀释到 2.5-13mg/ml，化合物 C-3 配制成 20mg/ml DMA 溶液。将 5.0 当量小分子的 DMA 溶液加入到反应体系中，25℃下搅拌 1 h。偶联结束后用 pH 7.4 的 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液置换溶液体系，使用疏水色谱 HIC-HPLC、
- 10 NR-CE-SDS 对样品各组分进行分析，结果见表 2-4。

表 2-4. 抗体浓度对偶联结果的影响

抗体浓度 (mg/ml)	HIC-HPLC (D3%/D4%/D5%)	NR-CE-SDS (%)
2.5	15.21/74.68/8.99	89.4
3.5	11.58/80.12/8.19	91.7
5.0	11.32/81.23/7.36	91.1
7	10.54/83.72/5.67	90.6
10	11.31/81.47/7.56	90.5
13	14.31/75.68/9.56	88.5

从表 2-4 可以看出，抗体浓度在 3.5-10mg/ml 皆可取得良好的偶联结果。

因此，偶联反应抗体浓度可选择在 3.5-10mg/ml。

e. 反应温度选择：

抗体还原偶联过程参照实施例 2a，抗体还原结束后，用 pH 7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+100mM NaCl+2mM EDTA 缓冲液置换溶液体系并将  
5 抗体浓度稀释至约 5mg/ml，然后反应体系预热到 25±10°C，向反应体系中加入化合物 C-1 的 DMA 溶液，在相应温度下搅拌 1 h。反应结束后，用 pH 7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液置换溶液体系，使用疏水色谱 HIC-HPLC、SEC-HPLC、NR-CE-SDS 对样品各组分进行分析，结果见表 2-5。

表 2-5. 不同反应温度对偶联结果的影响

反应温度 (°C)	HIC-HPLC (D3%/D4%/D5%)	SEC 主峰比例(%)	NR-CE-SDS 纯度 (%)
15	6.77/81.93/11.30	98.0	95.3
20	7.13/81.63/11.24	97.9	95.9
25	9.37/80.80/9.41	97.7	95.0
30	8.05/80.84/10.77	97.2	94.9
35	8.16/79.94/10.76	97.3	95.1

10 结果显示：在 25±10°C 范围内，反应皆取得较好的反应结果。因此，25±10°C 皆为可以选择的温度。

实施例 3 抗体水解条件实验筛选

a. 反应温度、pH 和时间选择：

15 pertuzumab 还原偶联过程参照实施例 2a，偶联后将抗体偶联药物置换到 pH 7.4-9.0 的 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，在 25-45°C 条件下搅拌 3h，观察反应液颜色变化情况。结果见表 3-1。

表 3-1. 抗体偶联药物在不同温度、pH 条件下水解情况

温度 (°C)	pH	水解时间	颜色	水解结果
25	7.4	6hr	淡黄色	部分水解
30	7.4	4hr	淡黄色	部分水解
25	7.6	4hr	淡黄色	部分水解
30	7.6	4hr	淡黄色	部分水解
35	7.6	4hr	淡黄色	部分水解
30	7.8	3hr	淡黄色	部分水解

35	7.8	2hr	基本无色透明	完全水解
30	8.0	6hr	无色透明	完全水解
35	8.0	4hr	无色透明	完全水解
45	8.5	2hr	无色透明	完全水解
45	9.0	2hr	无色透明	抗体脱酰胺 明显

结果显示：温度  $35\pm 10^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}8.0\pm 0.5$  范围内，反应时间  $\geq 2\text{hr}$ ，抗体偶联产物均可顺利水解。

b. 小分子选择：

pertuzumab 还原偶联过程参照实施例 2a。将采用不同小分子化合物偶联后的样品在  $\text{pH}7.8$   $50\text{mM}$  磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中， $35^{\circ}\text{C}$  水解 3-18 h，不同时间点取样后送检 Native Ms，检测样品的水解比例，结果见表 3-2。

表 3-2. 不同小分子化合物偶联样品水解后 Native Ms 结果

小分子	DAR (LC-MS)	实测裸抗分子量	ADC 水解前分子量	3h 水解后分子量	6h 水解后分子量	18h 水解后分子量	3h 水解比例 (%)	6h 水解比例 (%)	18h 水解比例 (%)
C-3	3.99	148089.44	154181.23	154235.9	154236.8	NA	98.31	99.56	NA
C-1	3.99	148085.99	154032.2	154078.14	154091.94	NA	79.08	98.25	NA
A-2	3.99	148087.56	154268.5 4	154282.1 3	154291.1 2	154304.1 5	17.85	30.33	48.43
A-4	3.98	148087.56	154293.16	154311.8 7	154320.8 7	154331.6 5	25.99	38.49	53.46
A-5	3.98	148087.92	154025.21	154030.45	154037.27	154037.94	7.29	16.76	28.81
B-6	3.99	148088.12	154293.16	154309.6 2	154317.1 5	154327.4 3	22.86	33.32	47.60
B-7	3.99	148086.67	154140.12	154165.7 9	154180.6 3	154196.0 7	34.10	54.71	76.15
D-1	3.97	148086.53	153354.23	153360.45	153362.56	153372.48	4.74	7.67	21.44

结果显示：在小分子化合物为 C-1、C-3 时，3 小时或 6 小时即可几乎全部水解，A-2、A-4、B-6、B-7 时的偶联样品在  $35^{\circ}\text{C}$  条件下在缓冲液中也能顺利水解，但水解比例相对较低。

## c. 水解体系的选择:

pertuzumab 还原偶联过程参照实施例 2a。将采用不同小分子化合物偶联后的样品分别置换于不同的水解溶液体系 (A: 50 mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH 7.8; B: 50 mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 + 3%精氨酸, pH 7.8; C: 50mM 磷酸二氢钾-磷酸氢钾缓冲液, pH 7.8; D: 50mM 氨基丁三醇-盐酸缓冲液, pH 7.8) 不同时间点取样后送检 Native Ms, 检测样品的水解比例, 结果见表 3-3。

表 3-3. 不同水解体系水解比例

小分子	A		B		C		D	
	1 h 水解比例 (%)	3 h 水解比例 (%)	1 h 水解比例 (%)	3 h 水解比例 (%)	1 h 水解比例 (%)	3 h 水解比例 (%)	1 h 水解比例 (%)	3 h 水解比例 (%)
C-3	90.31	99.56	97.52	99.41	90.55	99.70	88.36	99.34
C-1	85.31	99.56	94.52	99.87	87.52	99.70	84.78	99.79
A-3	89.31	99.32	93.48	99.41	92.52	99.70	90.33	99.31
A-4	15.65	25.99	18.17	35.23	14.98	26.13	14.56	25.32
B-7	15.83	34.10	26.12	51.25	15.12	35.12	16.62	36.43

结果显示: C-3、C-1 以及 A-3 在几种缓冲液中均可迅速水解, 在含有精氨酸体系中水解速度更快。而 A-4、B-7 化合物在 pH 值相同的情况下则可能需要更长的水解时间。

## d. ADC 药物浓度的选择

pertuzumab 还原偶联过程参照实施例 2a。将偶联后的样品置换至 50 mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠, pH 7.8 的水解体系中, 不同时间点取样后送检 Native Ms, 检测样品的水解比例, 结果见表 3-4。

表 3-4. 不同抗体偶联产物浓度水解速率

浓度 (mg/ml)	1 h 水解比例 (%)	2 h 水解比例 (%)	3 h 水解比例 (%)
2	74.53	86.63	89.51
5	87.14	97.25	98.22
10	97.43	98.62	99.07
12	98.01	99.19	99.63
15	98.05	99.23	99.58
20	93.26	99.27	99.22

30	75.93	79.82	83.12
----	-------	-------	-------

结果显示：当 ADC 浓度低于 5mg/mL 时，或浓度大于 20mg/mL 时，尽管延长了水解反应时间，水解比例仍低于 5-20mg/mL ADC 浓度时。

#### 实施例 4 抗体纯化条件实验筛选

- 5 使用高浓度的硫酸铵对经水解后的 ADC 药物进行电导调节，将电导调节至固定相的电导值附近后，样品经过滤上样至不同填料的层析柱，使用固定相进行洗脱，合并收集纯化后的样品。

##### a. 填料选择：

- 10 抗体还原偶联过程参照实施例 2a，偶联后样品换液至 pH 7.8 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，在 35°C 下孵育大于 3 小时，得到的抗体偶联产物用于填料筛选试验。不同配基和不同支架的填料在相同层析条件下进行柱层析，筛选填料的种类及筛选结果见表 4-1。

表 4-1. 不同种类填料筛选结果

填料种类	收率 (%)	结果
Butyl Sepharose 4FF	70	D3 大部分流穿，D4 少量流穿
Butyl Sepharose HP	65	D3 与 D4 基本分离，但 D4 不能正常洗脱
Capto Butyl Impres	65	D3 与 D4 分离效果差
Capto Phenyl Impres	68	D3 与 D4 基本分离，但 D4 不能正常洗脱
Capto Butyl	70	D3 与 D4 分离效果差
Butyl 650M	NA	结合力强，不能正常洗脱

- 15 结果显示，Butyl Sepharose 4FF、Butyl Sepharose HP、Capto Phenyl Impres 均可以纯化偶联后样品。综合考虑收率和样品性质，优先使用 Butyl Sepharose 4FF，采用 D3 流穿的方案纯化偶联样品。

##### b. 层析盐及其浓度选择：

- 20 抗体还原偶联过程参照实施例 2a，将样品置换至 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠，pH 7.8 的溶液，并稀释至 12mg/mL。35°C 水解 3 小时后，使用 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+1.0-2.0 mol/L 氯化钠的层析盐溶液、或 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+0.325-0.45mol/L 硫酸铵的层析盐溶液作为固定相，

使用 50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠的层析盐溶液作为洗脱相，对 pertuzumab 与化合物偶联水解后样品用 Butyl Sepharose 4FF 进行柱层析，分离结果见表 4-2。

表 4-2. 不同种类盐及盐浓度对纯化结果的影响

固定相层析盐种类	固定相层析盐浓度 (mol/L)	上样载量 (mg/ml)	分离效果	收率 (%)	HIC-HPLC 主峰 (D4) 比例 (%)
氯化钠	1.0	10	样品流穿	NA	NA
	1.5	10	良好	70	95
	1.5	15	良好	67	96
	1.5	20	样品流穿	NA	NA
	2.0	20	良好	65	94
硫酸铵	0.325	10	良好	75	95
	0.325	15	样品流穿	NA	NA
	0.45	15	良好	76	90
	0.45	20	良好	75	96

- 5 结果显示：氯化钠和硫酸铵两种盐均可用于该柱层析工艺，考虑收率和样品异质性，优选 0.45mol/L 硫酸铵作为固定相的层析盐溶液。

#### 实施例 5 抗体工艺放大条件实验筛选

- 10 将反应规模放大： $\geq 100\text{mg}$ ，考察该工艺可放大性并进一步调整偶联工艺条件。

- 15 在 $\geq 100\text{mg}$  规模，将 Pertuzumab 换液至 pH7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，稀释至约 12mg/ml 蛋白浓度，将 10 mg/ml TCEP 水溶液(TCEP 为 6.5 倍抗体当量) 加入到反应体系中，在 35°C 下孵育 2 小时，然后换液至 pH7.2 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+100mM NaCl+2mM EDTA 缓冲液中，并稀释至 8mg/mL，随后向反应体系中加入如下表所示当量比 eq 的预先溶解在 DMA 中的小分子化合物 C-3，并向反应体系中加入 DMA 使之达到 10%，加热搅拌 1 小时。偶联结束后，用 pH7.8 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液置换溶液体系，并使抗体偶联产物浓度为 12mg/mL，经 35°C 加热 3 小时后，使用 HIC-HPLC 检测，结果见表 5-1。

表 5-1.  $\geq 100\text{mg}$  反应规模不同反应条件实验结果

反应规模	小分子当量	溶液置换方法	HIC-HPLC 主峰 (D4) 比例 (纯化前主峰面积) (%)	水解比例 (%)
100 mg	4.8	超滤离心管	77.3	100
126 mg	4.8	G25	79.5	100
152 mg	4.5	G25	81.2	100
157 mg	4.8	G25	82.3	100
149 mg	4.5	G25	80.7	100
154 mg	5.0	G25	83.6	100
198 mg	4.8	G25	82.1	100
204 mg	4.8	G25	80.1	100
307 mg	4.8	G25	79.8	100
294 mg	4.8	G25	77.5	100
3.5 g	4.5	超滤膜包	83.2	100
3.2 g	4.8	超滤膜包	82.7	100

结果显示： $\geq 100\text{mg}$  规模，采用本发明的方法皆可取得与小试基本一致的偶联结果，该偶联工艺可顺利放大。

#### 5 实施例 6 不同小分子化合物与抗体偶联实验

将 Pertuzumab 换液至 pH7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，稀释至约 12mg/ml 蛋白浓度，将 10 mg/ml TCEP 水溶液 (TCEP 为 6.5 倍抗体当量) 加入到反应体系中，在 35°C 下孵育 2 小时，然后换液至 pH7.2 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+100mM NaCl+2mM EDTA 缓冲液中，并稀释至 8mg/mL，随后分别向反应体系中加入溶有小分子化合物 A-1 或 C-3 (0.6eq) 的 DMA 有机共溶剂，加热搅拌 1 h。然后超滤离心换液至 pH7.8 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，并使抗体偶联产物浓度为 12mg/mL，在 35°C 孵育 3 h。水解后样品经 3M 硫酸铵进行电导调节后，使用 Butyl Sepharose 4FF 填料和 0.45M 硫酸铵作为层析盐的 50mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠固定相，50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠作为流动相，固定相与流动相的 pH 值均为 7.5。纯化，得到的纯化液浓缩换液至 pH 7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠

缓冲液中，分别检测 HIC-HPLC、SEC-HPLC、NR-CE-SDS，结果见表 6-1。

表 6-1 不同小分子化合物与抗体偶联实验结果

化合物	抗体	偶联规模	收率 (%)	HIC-HPLC 主峰 (D4) 比例 (%)	SEC 聚体 (%)	NR-CE-SDS (%)
A-1	Pertuzumab	150 mg	70	97	1.3	97.7
C-3	Pertuzumab	120 mg	67	97	1.2	96.4

从表中数据可以看出，不同化合物 A-1、C-3 均适合此偶联工艺，结果一致性良好。

5

#### 实施例 7 不同小分子化合物与不同抗体大规模偶联实验

参照实施例 6，将针对 HER2 (Pertuzumab)、CD20 (Rituximab) 这些不同靶点的 IgG1 抗体与小分子化合物偶联，制备后检测，结果显示该工艺对于不同靶点的 IgG1 抗体均具有良好的适用性。结果见表 7-1 和图 1。

10

表 7-1 不同小分子化合物与不同抗体大规模偶联实验结果

抗体	小分子化合物	偶联规模	HIC-HPLC 主峰 (D4) 比例 (纯化后终产品) (%)	聚体 (%)	NR-CE-SDS (%)
Pertuzumab	C-3	3.2 g	96.40	0.6	95.6
Rituximab	C-3	10 g	96.88	1.35	96.08

可以看出，针对不同靶点不同抗体序列的 IgG1 类抗体均适合本发明提供的 ADC 制备方法。

15

实施例 8 不同制备方法 ADC 样品理化性质、体外/体内稳定性、体内药效及安全性。

如上述实施例 6 方法，将 2.5g 的 Pertuzumab 进行还原并于 pH7.2 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠+100mM NaCl+2mM EDTA 缓冲液中，与小分子化合物 C-1 进行偶联并使用超滤膜包置换至 pH 7.8 的缓冲液中，得到终产物进行分组为 A、B 两组。

20

组 A 样品直接经 Butyl Sepharose 4FF 填料纯化，得到的纯化液浓缩换液至 pH 7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中，获得组 A 样品原液，浓

度为 10mg/mL。组 B 样品在 35°C 下孵育 3 h 后,再使用组 A 相同方法经 Butyl Sepharose 4FF 填料纯化,得到的纯化液浓缩换液至 pH 7.4 50mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中,获得组 B 样品原液,浓度约 10mg/mL。

a. 理化性质考察:

- 5 分别对组 A 以及组 B 样品进行质谱、非还原电泳、疏水层析以及 SEC 分析。上述结果表明,尽管通过纯化手段,同样能够提高组 A 与组 B 样品在 HIC、SEC 上的纯度比例,但组 B 样品的 NR CE-SDS 纯度更高。结果见表 8-1 和图 2。

表 8-1 不同工艺的偶联理化结果分析

分组	LC-MS 分子量	HIC-HPLC (%)	SEC 聚体 (%)	NR-CE-SDS (%)
组 A	154068	93.9	0.6	93.9
组 B	154088	93.8	0.7	98.2

- 10 b. 体内血浆稳定性考察:

将组 A、组 B 的样品使用生理盐水稀释至 1mg/ml,分别对食蟹猴进行给药,给药剂量为 6mg/kg。在 30 min、1 h、2 h、4 h、12 h、24 h、48 h、72 h、128 h 进行采血。取用标定好的 MMAE (MCE: HY-15162) 作为标准物质,对血浆中的游离 MMAE 进行检测。结果显示,尽管组 A 与组 B 样品的最大峰值均为 24 h,但组 B 的游离 MMAE 暴露量要显著小于组 A 的游离 MMAE,提示经过水解处理的组 B 样品在体内具有更加稳定。结果见表 8-2。

表 8-2 不同工艺的偶联游离 MMAE 结果分析

药物名称	性别	动物 ID	MMAE			
			t1/2	Tmax	Cmax	AUClast
			(h)	(h)	(ng/mL)	(h·ng/mL)
组 A	雄性	20-3301	48.3	24	0.46	41.71
	雌性	20-3302	52.6	24	0.48	56.27
组 B	雄性	20-3303	48	24	0.24	11.95
	雌性	20-3304	19.09	24	0.4	14.77

c. 体内生化指标检测

对 2.5 周龄以上的食蟹猴分组,随机选取 2 组雌雄各一只的食蟹猴。将组 A、组 B 的样品使用生理盐水稀释至 1mg/ml。使用静脉滴注方式进行给

药，给药剂量为 6mg/kg。给药后七天，对猴血液中的生化指标进行分析。结果表明，组 A 中异常指标及严重程度均较组 B 样品更为严重。

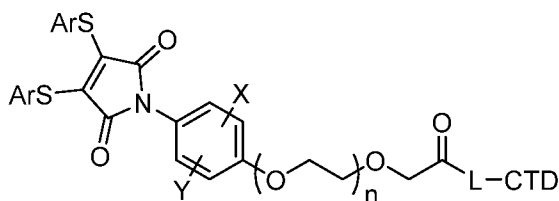
表 8-3 不同工艺的偶联体内药效结果分析

剂量	组 A		组 B	
	雄性	雌性	雄性	雌性
WBC (10 <sup>9</sup> /L)	2.18 (↓55%)	1.5 (↓68%)	4.16 (↓14%)	9.66
Neut (%)	2.8 (↓71%)	4.6 (↓80%)	6 (↓38%)	52.4
Lymph (%)	91.8 (↑11%)	93.2 (↑36%)	86.8 (↑5%)	39.1
Mono (%)	1.2	0.4 (↓55%)	2.6	3.1
Retic (%)	0.2 (↓48%)	0.09 (↓77%)	0.53	1.7
PLT (10 <sup>9</sup> /L)	408	350	395	650 (↑18%)
HGB (g/L)	130	104 (↓7%)	107 (↓6%)	122
EOS (%)	0.9	0.6	2.2	3.5
AST (U/L)	48	116 (↑14%)	55	70
ALT (U/L)	99 (↑9%)	221 (↑135%)	59	236 (↑151%)
CK (U/L)	295	800 (↑42%)	371	593

- 5 以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形，只要不脱离本发明的精神，均应属于本发明所附权利要求的范围。

## 权 利 要 求

1. 一种双取代桥连抗体偶联药物的制备方法, 所述制备方法包括: 使抗体和式 I 所示的化合物偶联得到的抗体偶联产物进行水解:



5

I

式 I 中, Ar 为苯基或取代苯基, 所述取代苯基中的取代基选自烷基、烷氧基、卤素、酯基、氰基和  $-C(O)NR_1R_2-$ , 其中  $R_1$  和  $R_2$  独立地选自化学键、H 和烷基, 或  $R_1$  和  $R_2$  形成 5-7 元杂环, 杂原子选自 O、N 和 S 中的一个或多个;

10 X 和 Y 独立地为氢、卤素、三氟甲基或烷氧基;  
n 为 1~24 中的任意整数;

L-CTD 为应用于 ADC 中细胞毒药物及连接释放结构。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法, 其特征在于, 所述烷基为 C1-C6 烷基、优选 C1-C3 烷基, 更优选甲基;

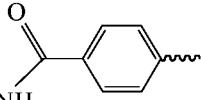
15 优选地, 所述烷氧基为 C1-C6 烷氧基、优选 C1-C3 烷氧基, 更优选甲氧基;

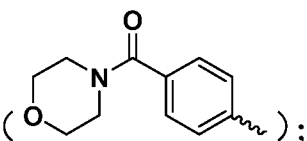
优选地, L 选自 Val-Ala-PAB (VA-PAB)、Val-Cit-PAB (VC-PAB)、Phe-Lys-PAB 和 MAC glucuronide phenol 连接子; CTD 例如为细胞毒药物, 优选微管抑制剂 (例如, 微管抑制剂类 MMAE、DM1、DM4、Tublysin); 拓扑异构酶抑制剂 (例如, 拓扑异构酶抑制剂类 SN38、依喜替康以及依喜替康衍生物) 或 DNA 结合剂 (例如, DNA 结合剂 PBD 及其衍生物)。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备方法, 其特征在于, 所述式 I 中:

$R_1$  和  $R_2$  独立地选自 H 和 C1-C3 烷基; 或者  $R_1$  和  $R_2$  形成 6 元杂环, 杂原子选自 O 和 N 中的一个或多个, 优选为吗啉;

25

优选地, Ar 为苯基、4-甲基甲酰胺基取代苯基()或 4-甲

酰基吗啉取代苯基 ();

优选地, X 和 Y 独立地为氢、氟、三氟甲基或甲氧基; 更优选地, X 和 Y 独立地为氢, 或者 X 和 Y 独立地位于苯环上相对马来酰亚胺的间位;

优选地, n 为 1~10、优选 3~5 中的任意整数;

5 优选地, L-CTD 为 VC-PAB-MMAE 或 VC-seco-DUBA。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的制备方法, 其特征在于, 所述水解在所述抗体偶联产物的纯化之前或之后进行;

10 优选地, 所述水解包括: 将抗体偶联产物在 pH 7.4-9.0 的水解缓冲液中在 25-45°C 下加热 1-24 h, 其中所述水解缓冲液包含磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、磷酸二氢钾、枸橼酸、甘氨酸、氨基丁三醇、盐酸精氨酸、盐酸氨酸、磷酸、氢氧化钠和氢氧化钾中的一种或多种;

优选地, 所述水解缓冲液为磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液、磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液或氨基丁三醇缓冲液;

15 优选地, 所述抗体偶联产物在水解缓冲液中的浓度为 2-30mg/mL、优选 5-20mg/mL。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的制备方法, 其特征在于, 所述水解包括: 将抗体偶联产物在所述水解缓冲液中在 25-35°C 下加热 1-6 h、优选 1-3 h;

优选地, 所述水解缓冲液为 pH 7.5-8.5, 优选 pH7.8;

20 优选地, 所述抗体为 IgG, 优选 IgG1。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法包括以下步骤:

25 a. 抗体还原: 将 $\geq 5.5$  倍抗体摩尔当量的还原剂加入到含 5-30mg/mL 浓度抗体的缓冲液中, 在 30-40°C 下反应 1.5-2 h, 其中所述还原剂为选自 TCEP、DTT、2-MEA 和 DTBA 中的一种或多种;

30 b. 抗体偶联: 将步骤 a 中经还原的抗体置换到 pH 6.5-7.6 的磷酸盐缓冲液中, 并将抗体稀释到 3.5-15mg/mL 浓度, 将溶解于有机共溶剂中的 4.5-6.5 倍抗体摩尔当量的式 I 所示的化合物加入到所述抗体稀释液中, 并使得所述有机共溶剂占反应体系体积的 5%-30%, 在 15-35°C 下搅拌反应 $\geq 0.5$  h, 其中所述有机共溶剂为选自 DMA、DMSO、DMF 和 ACN 中的一种或多种;

c. 疏水层析: 使用疏水填料对抗体偶联产物进行疏水层析纯化, 其中所述疏水填料为 Butyl Sepharose HP (GE)、Capto Phenyl Impres (GE)、Toyopearl Butyl 650M (TOSOH) 或 Butyl Sepharose 4FF (GE), 固定相使用氯化钠或硫酸铵作为层析盐的缓冲液; 并且

5 所述制备方法在步骤 b 之后或步骤 c 之后还包括以下步骤:

d. 水解: 将抗体偶联产物置换到 pH 7.4-9.0 的水解缓冲液中, 在 25-45°C 下加热 2-24 h, 其中所述水解缓冲液包含磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、磷酸二氢钾、枸橼酸、甘氨酸、氨基丁三醇、盐酸精氨酸、盐酸、磷酸、氢氧化钠和氢氧化钾中的一种或多种。

10 7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的制备方法, 其特征在于, 在所述步骤 a 中:

优选地, 所述还原剂为 TCEP 或 DTT;

优选地, 所述还原剂为 6.5-10 倍抗体摩尔当量;

优选地, 所述还原剂以 5-15 mg/mL、优选 10mg/mL 的水溶液形式加入;

15 优选地, 所述抗体为 IgG, 优选 IgG1;

优选地, 所述抗体的浓度为 10-15mg/mL、优选 12mg/mL;

优选地, 所述缓冲液为 pH 6.5-7.6 的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的制备方法, 其特征在于, 在所述步骤 b 中:

20 优选地, 所述缓冲液为 pH 7.2-7.4, 优选 pH 7.2-7.4 的磷酸盐缓冲液或磷酸盐-EDTA 缓冲液;

优选地, 置换时将抗体稀释到 3.5-10mg/mL 浓度;

优选地, 所述式 I 所示的化合物为 5.0-6.0 倍抗体摩尔当量;

优选地, 所述有机共溶剂为 DMA、DMSO 或 ACN;

25 优选地, 使得所述有机共溶剂占反应体系体积的 6%-30%;

优选地, 在 15-35°C 下搅拌反应 0.5-1 h。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的制备方法, 其特征在于, 在所述步骤 c 中: 固定相使用以硫酸铵作为层析盐的缓冲液, 硫酸铵浓度优选为 0.45mol/L;

30 优选地, 固定相使用以硫酸铵作为层析盐的磷酸盐缓冲液, 洗脱相为磷酸盐缓冲液;

更优选地, 磷酸盐为 0-100mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液, pH

7.4-8.0。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的制备方法，其特征在于，在所述步骤 d 中：

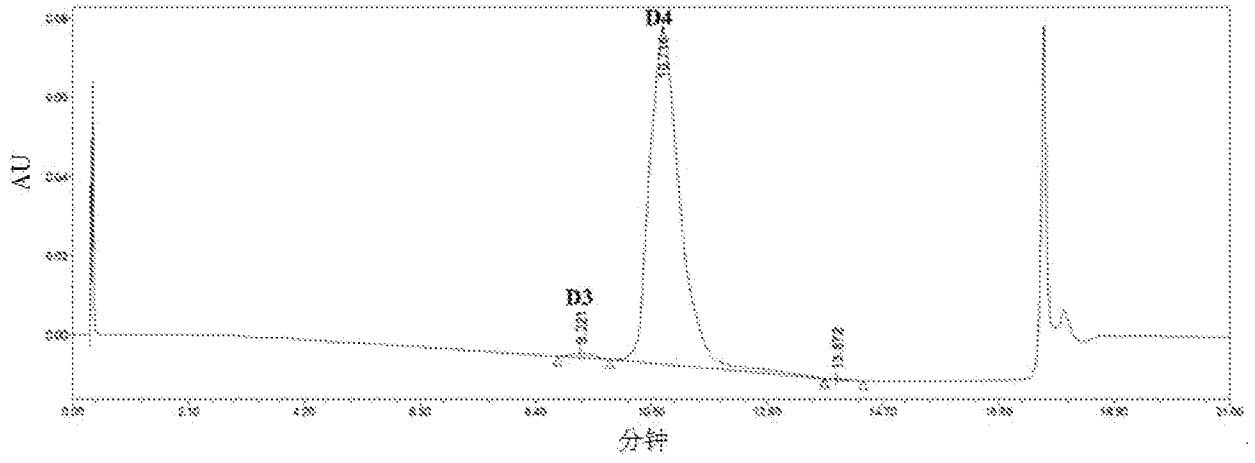
所述抗体偶联产物在水解缓冲液中的浓度为 2-30mg/mL、优选  
5 5-20mg/mL；

优选地，所述水解缓冲液为磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液、磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液或氨基丁三醇缓冲液；

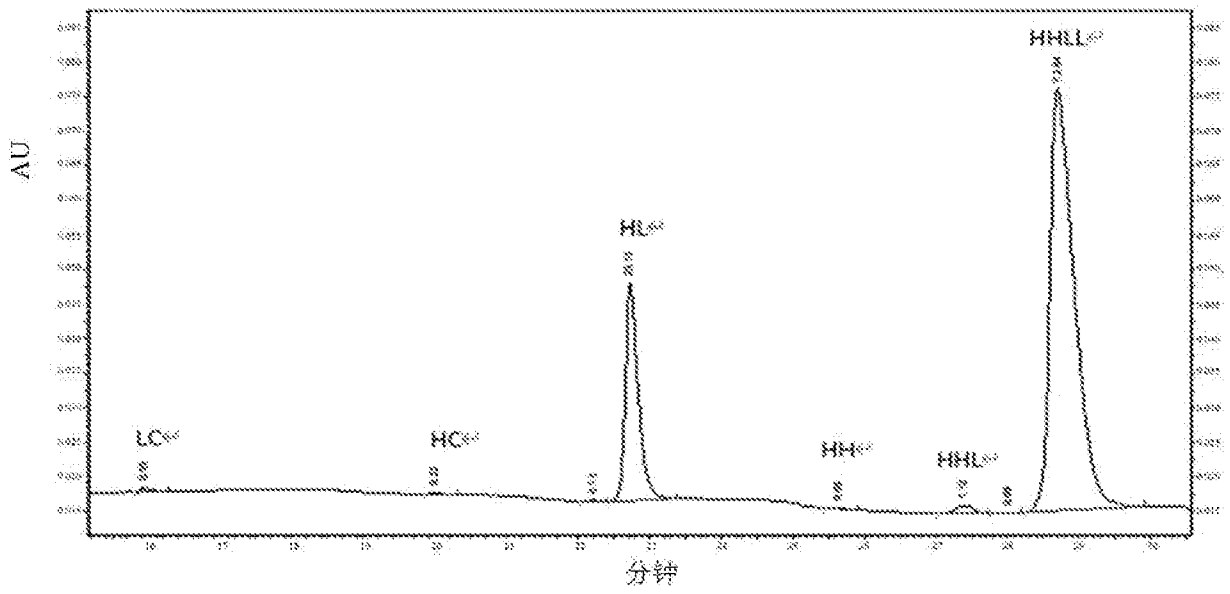
优选地，所述水解包括：将抗体偶联产物在所述水解缓冲液中在 25-35°C  
下加热 1-6 h、优选 1-3 h；

10 优选地，所述水解缓冲液为 pH 7.5-8.5，优选 pH 7.8。

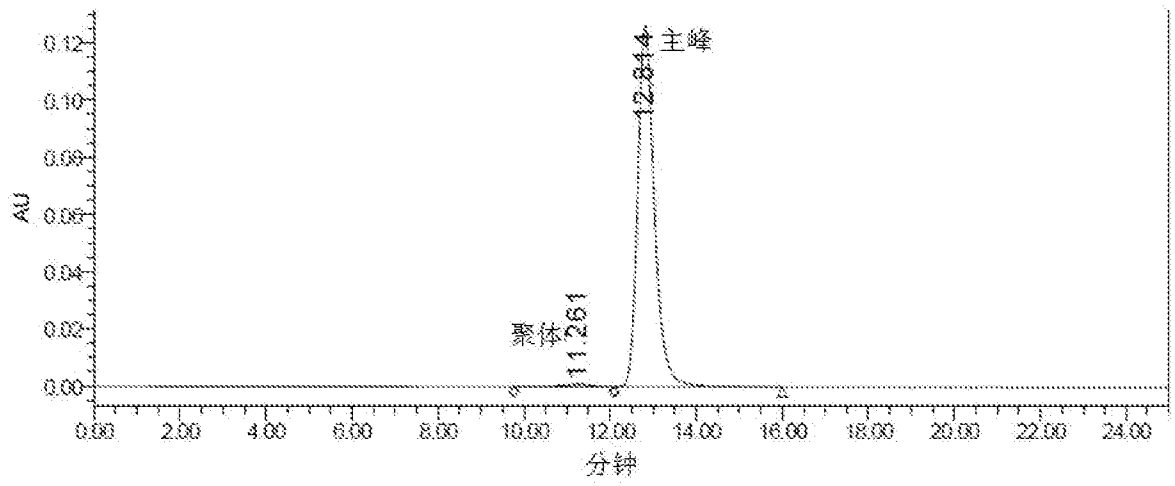
11. 通过权利要求 1 至 10 中任一项方法得到的抗体偶联产物。



1A

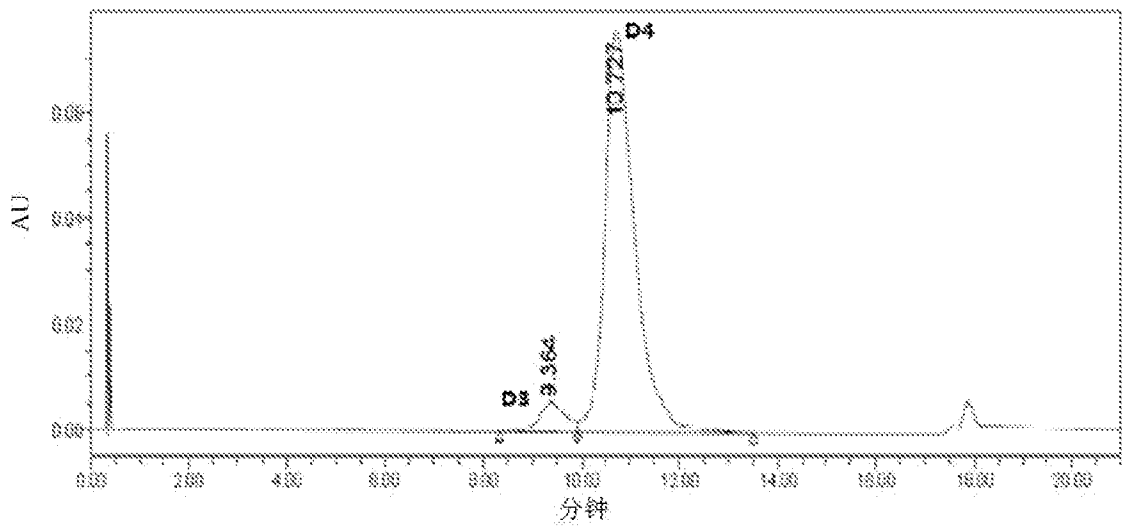


1B

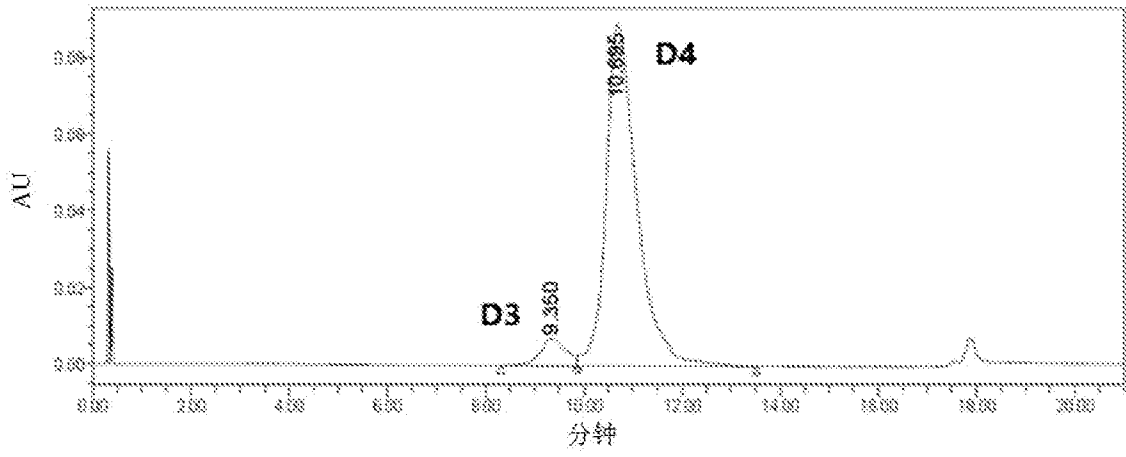


1C

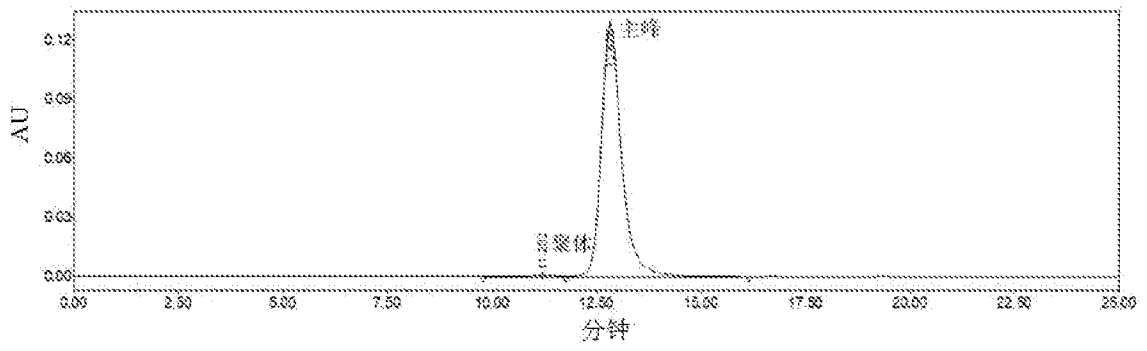
图 1



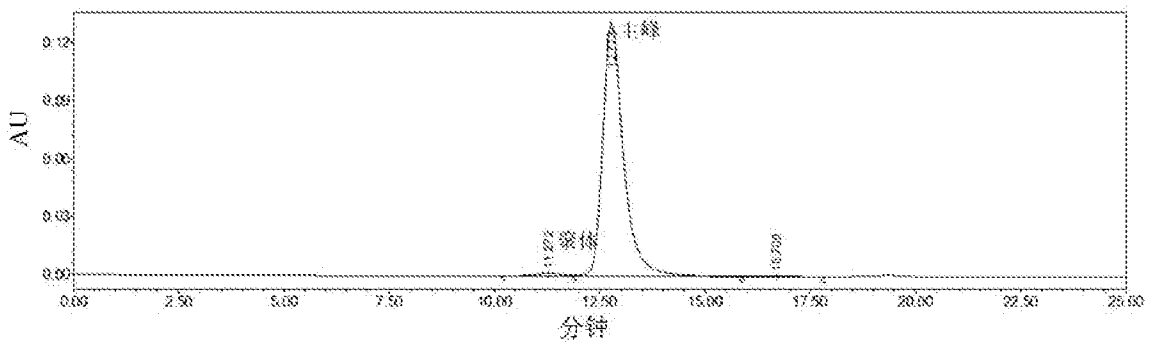
2A



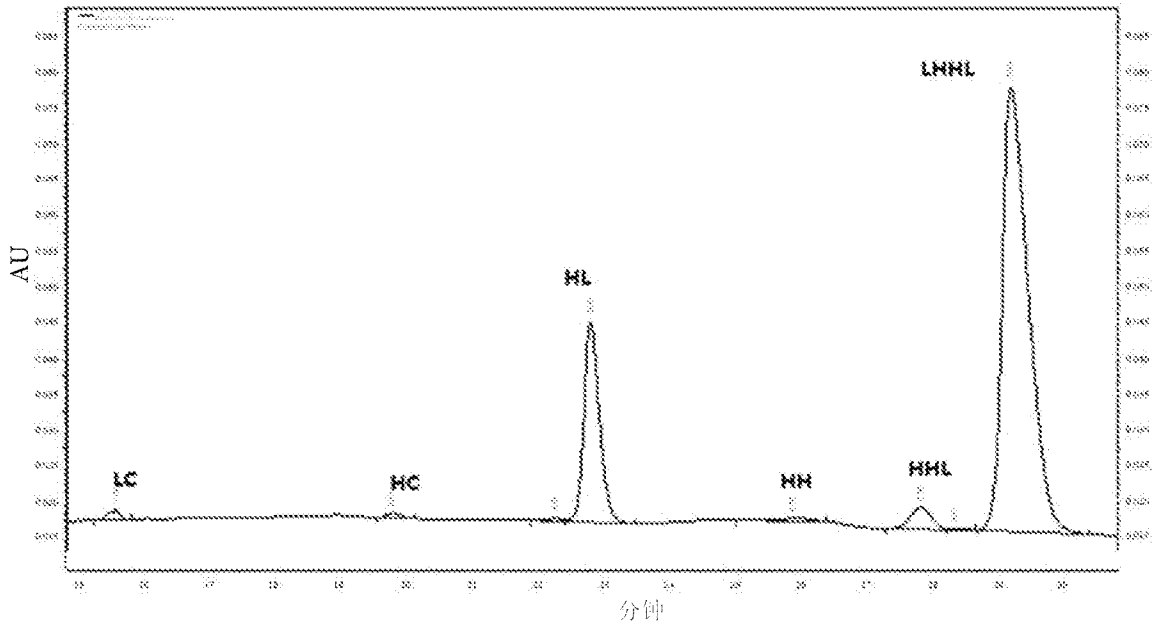
2B



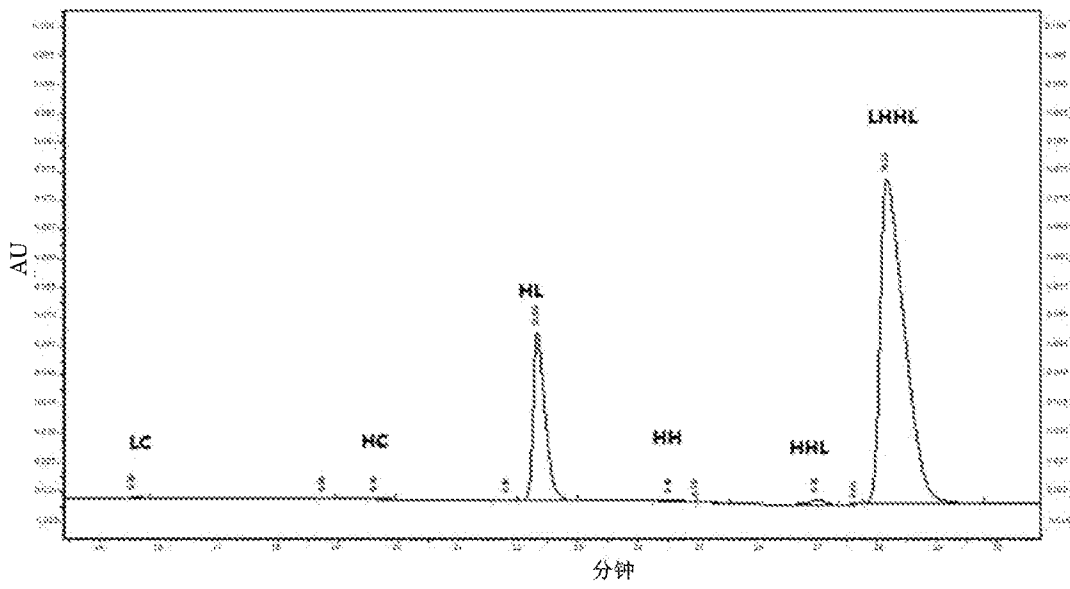
2C



2D



2E



2F

图 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121825

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07D 207/456(2006.01)i; C07D 401/14(2006.01)i; A61K 31/537(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 5/027(2006.01)i; C07K 5/06(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D; A61K; A61P; C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; SIPOABS; DWPI; CNKI; STNnext: 迈威 (上海) 生物科技; 周伟; 水解; 开环; 马来酰亚胺; 抗体偶联药物; hydrolysis; ring open?; antibody drug conjugate; ADC		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110577600 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 17 December 2019 (2019-12-17) claims 13, 24; description paragraphs 0119-0127	1-11
X	CN 110240654 A (FUDAN UNIVERSITY) 17 September 2019 (2019-09-17) description, paragraphs 0219-0230	1-11
X	CN 110575547 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 17 December 2019 (2019-12-17) claims 1, 13; description paragraphs 0071-0079	1-11
X	CN 110575548 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 17 December 2019 (2019-12-17) claims 1, 12; description paragraphs 0063-0071	1-11
Y	CN 109810039 A (SHANGHAI QINGRUN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 28 May 2019 (2019-05-28) claim 5; description paragraphs 0072-0083	1-11
Y	CN 108452321 A (SICHUAN BAILI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 28 August 2018 (2018-08-28) description, paragraphs 0006 and 0058	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>15 December 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>30 December 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2021/121825**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013121175 A1 (UCL BUSINESS PLC) 22 August 2013 (2013-08-22) entire document	1-11
A	CN 104822656 A (SEATTLE GENETICS INC.) 05 August 2015 (2015-08-05) entire document	1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/121825**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110577600	A	17 December 2019	CN	110577600	B	04 May 2021
CN	110240654	A	17 September 2019	EP	3783025	A1	24 February 2021
				US	2021024646	A1	28 January 2021
				CN	110869393	A	06 March 2020
				CA	3093327	A1	12 September 2019
CN	110575547	A	17 December 2019	None			
CN	110575548	A	17 December 2019	None			
CN	109810039	A	28 May 2019	None			
CN	108452321	A	28 August 2018	EP	3769786	A1	27 January 2021
				WO	2018233571	A1	27 December 2018
				SG	11202007919 R	A	29 September 2020
				US	2021100912	A1	08 April 2021
				AU	2018288029	A1	21 January 2021
				WO	2018233571	A9	22 August 2019
				CA	3095067	A1	27 December 2018
				DE	112018007259	T5	24 December 2020
WO	2013121175	A1	22 August 2013	EP	2814512	A1	24 December 2014
				US	10010623	B2	03 July 2018
				US	2015037360	A1	05 February 2015
CN	104822656	A	05 August 2015	CA	2869777	A1	21 November 2013
				MX	2014013807	A	04 February 2015
				AU	2020202805	B2	17 December 2020
				NZ	724892	A	27 April 2018
				EA	201401254	A1	30 September 2015
				MX	368678	B	11 October 2019
				JP	6423340	B2	14 November 2018
				MX	2019012201	A	28 November 2019
				CN	104822656	B	01 May 2018
				SG	10201608904 Y	A	29 December 2016
				JP	2018162251	A	18 October 2018
				NZ	741211	A	27 September 2019
				AU	2013263002	A1	25 September 2014
				KR	102144069	B1	13 August 2020
				HK	1207388	A1	29 January 2016
				EP	2850094	A2	25 March 2015
				AU	2013263002	C1	31 May 2018
				JP	2015521187	A	27 July 2015
				JP	6709247	B2	10 June 2020
				ZA	201407369	B	26 February 2020
				AU	2020202805	A1	21 May 2020
				EP	2850094	A4	06 July 2016
				KR	20200097000	A	14 August 2020
				AU	2018201190	A1	08 March 2018
				BR	112014028222	A2	27 June 2017
				JP	2020122023	A	13 August 2020
				EA	037203	B1	18 February 2021
				CN	108465112	A	31 August 2018
				WO	2013173337	A3	11 June 2015
				AU	2021201636	A1	08 April 2021

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/121825**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		WO 2013173337 A2	21 November 2013
		AU 2018201190 B2	30 January 2020
		SG 11201406252 W A	30 October 2014
		KR 20150009991 A	27 January 2015
		AU 2013263002 B2	30 November 2017
		NZ 630870 A	28 October 2016

---

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/121825

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07D 207/456(2006.01)i; C07D 401/14(2006.01)i; A61K 31/537(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 5/027(2006.01)i; C07K 5/06(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																																									
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07D; A61K; A61P; C07K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;CNTXT;SIPOABS;DWPI;CNKI;STNext:迈威(上海)生物科技;周伟;水解;开环;马来酰亚胺;抗体偶联药物;hydrolysis;ring open?;antibody drug conjugate;ADC</p>																																									
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 110577600 A (中国科学院上海药物研究所等) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 权利要求13, 24; 说明书第0119-0127段</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 110240654 A (复旦大学) 2019年9月17日 (2019 - 09 - 17) 说明书第0219-0230</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 110575547 A (中国科学院上海药物研究所等) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 权利要求1, 13; 说明书第0071-0079段</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 110575548 A (中国科学院上海药物研究所) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 权利要求1, 12; 说明书第0063-0071段</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 109810039 A (上海青润医药科技有限公司) 2019年5月28日 (2019 - 05 - 28) 权利要求5; 说明书第0072-0083段</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108452321 A (四川百利药业有限责任公司) 2018年8月28日 (2018 - 08 - 28) 说明书第0006, 0058段</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013121175 A1 (UCL BUSINESS PLC) 2013年8月22日 (2013 - 08 - 22) 全文</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104822656 A (西雅图基因公司) 2015年8月5日 (2015 - 08 - 05) 全文</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文件的具体类型:</td> <td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</td> <td>“&amp;” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 110577600 A (中国科学院上海药物研究所等) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 权利要求13, 24; 说明书第0119-0127段	1-11	X	CN 110240654 A (复旦大学) 2019年9月17日 (2019 - 09 - 17) 说明书第0219-0230	1-11	X	CN 110575547 A (中国科学院上海药物研究所等) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 权利要求1, 13; 说明书第0071-0079段	1-11	X	CN 110575548 A (中国科学院上海药物研究所) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 权利要求1, 12; 说明书第0063-0071段	1-11	Y	CN 109810039 A (上海青润医药科技有限公司) 2019年5月28日 (2019 - 05 - 28) 权利要求5; 说明书第0072-0083段	1-11	Y	CN 108452321 A (四川百利药业有限责任公司) 2018年8月28日 (2018 - 08 - 28) 说明书第0006, 0058段	1-11	A	WO 2013121175 A1 (UCL BUSINESS PLC) 2013年8月22日 (2013 - 08 - 22) 全文	1-11	A	CN 104822656 A (西雅图基因公司) 2015年8月5日 (2015 - 08 - 05) 全文	1-11	* 引用文件的具体类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“&” 同族专利的文件	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																																							
X	CN 110577600 A (中国科学院上海药物研究所等) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 权利要求13, 24; 说明书第0119-0127段	1-11																																							
X	CN 110240654 A (复旦大学) 2019年9月17日 (2019 - 09 - 17) 说明书第0219-0230	1-11																																							
X	CN 110575547 A (中国科学院上海药物研究所等) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 权利要求1, 13; 说明书第0071-0079段	1-11																																							
X	CN 110575548 A (中国科学院上海药物研究所) 2019年12月17日 (2019 - 12 - 17) 权利要求1, 12; 说明书第0063-0071段	1-11																																							
Y	CN 109810039 A (上海青润医药科技有限公司) 2019年5月28日 (2019 - 05 - 28) 权利要求5; 说明书第0072-0083段	1-11																																							
Y	CN 108452321 A (四川百利药业有限责任公司) 2018年8月28日 (2018 - 08 - 28) 说明书第0006, 0058段	1-11																																							
A	WO 2013121175 A1 (UCL BUSINESS PLC) 2013年8月22日 (2013 - 08 - 22) 全文	1-11																																							
A	CN 104822656 A (西雅图基因公司) 2015年8月5日 (2015 - 08 - 05) 全文	1-11																																							
* 引用文件的具体类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件																																								
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性																																								
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性																																								
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“&” 同族专利的文件																																								
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件																																									
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件																																									
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																																								
2021年12月15日	2021年12月30日																																								
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																																								
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	吴铁生																																								
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86) 10-53961870																																								

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/121825

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110577600	A	2019年12月17日	CN	110577600	B	2021年5月4日
CN	110240654	A	2019年9月17日	EP	3783025	A1	2021年2月24日
				US	2021024646	A1	2021年1月28日
				CN	110869393	A	2020年3月6日
				CA	3093327	A1	2019年9月12日
CN	110575547	A	2019年12月17日	无			
CN	110575548	A	2019年12月17日	无			
CN	109810039	A	2019年5月28日	无			
CN	108452321	A	2018年8月28日	EP	3769786	A1	2021年1月27日
				WO	2018233571	A1	2018年12月27日
				SG	11202007919R	A	2020年9月29日
				US	2021100912	A1	2021年4月8日
				AU	2018288029	A1	2021年1月21日
				WO	2018233571	A9	2019年8月22日
				CA	3095067	A1	2018年12月27日
				DE	112018007259	T5	2020年12月24日
WO	2013121175	A1	2013年8月22日	EP	2814512	A1	2014年12月24日
				US	10010623	B2	2018年7月3日
				US	2015037360	A1	2015年2月5日
CN	104822656	A	2015年8月5日	CA	2869777	A1	2013年11月21日
				MX	2014013807	A	2015年2月4日
				AU	2020202805	B2	2020年12月17日
				NZ	724892	A	2018年4月27日
				EA	201401254	A1	2015年9月30日
				MX	368678	B	2019年10月11日
				JP	6423340	B2	2018年11月14日
				MX	2019012201	A	2019年11月28日
				CN	104822656	B	2018年5月1日
				SG	10201608904Y	A	2016年12月29日
				JP	2018162251	A	2018年10月18日
				NZ	741211	A	2019年9月27日
				AU	2013263002	A1	2014年9月25日
				KR	102144069	B1	2020年8月13日
				HK	1207388	A1	2016年1月29日
				EP	2850094	A2	2015年3月25日
				AU	2013263002	C1	2018年5月31日
				JP	2015521187	A	2015年7月27日
				JP	6709247	B2	2020年6月10日
				ZA	201407369	B	2020年2月26日
				AU	2020202805	A1	2020年5月21日
				EP	2850094	A4	2016年7月6日
				KR	20200097000	A	2020年8月14日
				AU	2018201190	A1	2018年3月8日
				BR	112014028222	A2	2017年6月27日
				JP	2020122023	A	2020年8月13日
				EA	037203	B1	2021年2月18日
				CN	108465112	A	2018年8月31日
				WO	2013173337	A3	2015年6月11日
				AU	2021201636	A1	2021年4月8日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/121825

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		WO	2013173337	A2	2013年11月21日
		AU	2018201190	B2	2020年1月30日
		SG	11201406252W	A	2014年10月30日
		KR	20150009991	A	2015年1月27日
		AU	2013263002	B2	2017年11月30日
		NZ	630870	A	2016年10月28日

---